

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

BIOLOGIE

GENETIKA, MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A VIROLOGIE



Bc. Daniela Krupicová

Expresse kandidátních genů karcinomu prostaty

(Expression of candidate genes for prostate cancer)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Jaroslav Mareš, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.8.2013

Podpis

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Jaroslavu Marešovi, CSc. za trpělivost a rady při řešení této diplomové práce. Poděkování patří i Lubomírovi Štěpánkovi za pomoc se statistickými analýzami.

Abstrakt

Karcinom prostaty je jedním z hlavních medicínských problémů mužské populace v České republice i v celosvětovém měřítku. V České republice je druhým nejčastějším typem nádoru, na který umírají muži, a jeho incidence výrazně stoupá s věkem.

Prostatické buňky mají v porovnání s ostatními tkáněmi lidského těla unikátní schopnost akumulovat zinek ve vysokých koncentracích. Ta je nutná pro správnou fyziologickou funkci prostaty. U nádorových prostatických buněk byla zjištěna ztráta této akumulační schopnosti, což se zdá být podmínkou kancerogeneze u prostatických buněk.

V této práci byla analyzována exprese čtyř genů podílejících se na udržování homeostaze zinku v prostatických buňkách. Geny ZIP1 a ZIP7 kódují zinkové transportéry, geny MT1-F a MT2 metalothioneiny.

Bylo shromážděno celkem 90 bioptických vzorků prostaty od pacientů s karcinomem nebo s benigní hyperplázií prostaty. Z těchto vzorků byla izolována mRNA, pomocí RT-PCR byla získána cDNA, která byla detekována elektroforózou a výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

Kromě několika závislostí mezi expresí genů a klinickými údaji pacientů byla především nalezena rozdílná míra exprese genů MT1-F a ZIP1 ve vzorcích pacientů s hyperplázií a pacientů s karcinomem. Tyto geny tak mohou v prostatických buňkách mít roli tumor supresorových genů.

Klíčová slova: karcinom prostaty, metalothionein 1F, metalothionein 2, ZIP1, ZIP7, izolace mRNA, exprese genu, benigní prostatická hyperplázie, semikvantitativní RT-PCR,

Abstract

Prostate cancer is one of the major medical problems within the male population in the Czech Republic and in the world. It is on second place among cancer illnesses with respect to mortality in czech male population. Its incidence strongly increases with age.

Prostate cells have a unique ability to accumulate zinc in high concentrations compared to other tissues of human body. It is necessary for the proper physiological function of the prostate. There was detected loss of this accumulation ability in prostate cancer cells, which seems to be a condition to carcinogenesis in prostate cells.

In this thesis was investigated the expression of four genes involved in the maintenance of homeostasis of zinc in prostate cells. Genes ZIP1 and ZIP7 encode zinc transporters, genes MT1-F and MT2 encode metallothioneins.

There was collected 90 biopsy specimens from patients with prostate cancer or with benign prostatic hyperplasia. mRNA was isolated from these samples, cDNA was obtained by RT-PCR. This cDNA was detected by gel electrophoresis and the results were statistically evaluated.

Several correlations was found between gene expression and the clinical data of patients. The most important result, there was found lower levels of expression of genes MT1-F and ZIP1 in samples of patients with cancer compared to patients with hyperplasia. Thus these genes may act as tumor suppressor genes in prostate cells.

Key words: prostate carcinoma, metallothionein 1F, metallothionein 2, ZIP1, ZIP7, mRNA isolation, gene expression, benign prostatic hyperplasia, semiquantitative RT-PCR

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle práce.....	9
3	Přehled literatury.....	10
3.1	Anatomie a fyziologie prostaty	10
3.2	Karcinom prostaty.....	11
3.2.1	Epidemiologie	11
3.2.2	Rizikové faktory	12
3.2.3	Patologie prostaty	14
3.2.4	Symptomy karcinomu prostaty	15
3.2.5	Diagnostika karcinomu prostaty.....	15
3.2.6	Prognóza a terapie karcinomu prostaty	17
3.3	Působení zinku v prostatických buňkách	19
3.4	Analyzované geny.....	22
3.4.1	Metalothioneiny - MT1-F a MT2.....	22
3.4.2	Zinkové transportéry - ZIP1 a ZIP7	26
4	Materiál a metody.....	30
4.1	Vzorky	30
4.2	Izolace mRNA	33
4.3	RT-PCR	34
4.4	Detekce fragmentů cDNA.....	36
4.5	Určení relativní exprese genů	36
4.6	Statistické vyhodnocení	37
5	Výsledky.....	39
5.1	Srovnání exprese genů mezi souborem kontrol a pacienty s KP	39
5.2	Korelace exprese genů s klinickým stádiem KP.....	42
5.3	Korelace exprese genů s Gleasonovým skórem	46
5.4	Korelace exprese genů s hladinou PSA	49
5.5	Korelace exprese genů s věkem.....	51
6	Diskuze	54
7	Souhrn	61
8	Seznam použité literatury	62

Seznam použitých zkratk

zkratka	český název	anglický název
ARE		antioxidant response element
β-ME	β-merkapt ethanol	
BPH	benigní prostatické hyperplázie	benign prostatic hyperplasia
DHT	dihydrotestosteron	
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru	epidermal growth factor receptor
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza	
GRE		glucocorticoid response element
GSTP-1	glutathion S-transferáza	glutathione S-transferase pi 1
GS	Gleason skóre	Gleason score
HG-PIN	prostatická interepiteliální neoplázie vysokého stupně diferenciac	high grade prostatic intraepithelial neoplasia
KP	karcinom prostaty	
LIV-1	(podrodina zinkových transportérů)	
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy	mitogen-activated protein kinase
MRE		metal responsive element
MT	metallothionein	metallothionein
MTF-1		metal-regulatory transcription factor-1
NF-κB	(transkripční faktor)	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
p	hladina významnosti	
PIN	prostatická interepiteliální neoplázie	prostatic intraepithelial neoplasia
PSA	prostatický specifický antigen	prostate specific antigen
r	Pearsonův korelační koeficient	
RREB-1	(transkripční faktor)	Ras responsive element binding protein-1
TNM	nádorová klasifikace	tumor-node-metaphasis classification
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR	
ZIP	(zinkový transportér)	ZRT/IRT-like proteins
ZnT	(zinkový transportér)	zinc transporter

1 Úvod

Karcinom prostaty patří v České republice i v celosvětovém měřítku na přední místa v incidenci a mortalitě nádorových onemocnění. Toto onemocnění postihuje zejména starší muže nad 50 let. Jeho incidence výrazně roste právě se stoupajícím věkem. Protože délka života se především ve vyspělých zemích neustále prodlužuje, bude se toto onemocnění postupně týkat stále větší části mužské populace.

Proto je důležité mít možnost včasné a přesné diagnostiky onemocnění a odlišení agresivnějších typů karcinomu od nádorů klinicky němých. K tomu je nutné co nejvíce prostudovat a pochopit patogenezi tohoto onemocnění a na základě získaných poznatků se následně pokusit vyvinout také cílenou a účinnou terapii, popř. ještě lépe účinnou prevenci.

Ale jako u většiny ostatních nádorových onemocnění není nyní známa přesná příčina vzniku karcinomu prostaty. Přerod zdravé buňky v buňku nádorovou je vícestupňový proces, ve kterém hraje roli mnoho faktorů. U prostatických buněk se zdá, že jedním z těchto stupňů je ztráta schopnosti akumulovat zinek, tj. ztráta schopnosti unikátní právě pro prostatické buňky. U nádorových prostatických buněk byly naměřeny několikanásobně snížené hladiny zinečnatých kationtů a s tím související hladiny citrátu. Právě zkoumání metabolismu zinku v prostatických buňkách by mohlo vést k vyvinutí přesnější diagnostiky karcinomu prostaty a také specifické terapie.

Intracelulární hladinu zinku v prostatických buňkách regulují metalothioneiny a zinkové přenašeče. Právě do těchto dvou skupin patří proteiny kódované geny, jejichž exprese je v této práci analyzována. Výsledky této práce by tedy mohly přidat další střípek do mozaiky poznání patogeneze karcinomu prostaty.

2 Cíle práce

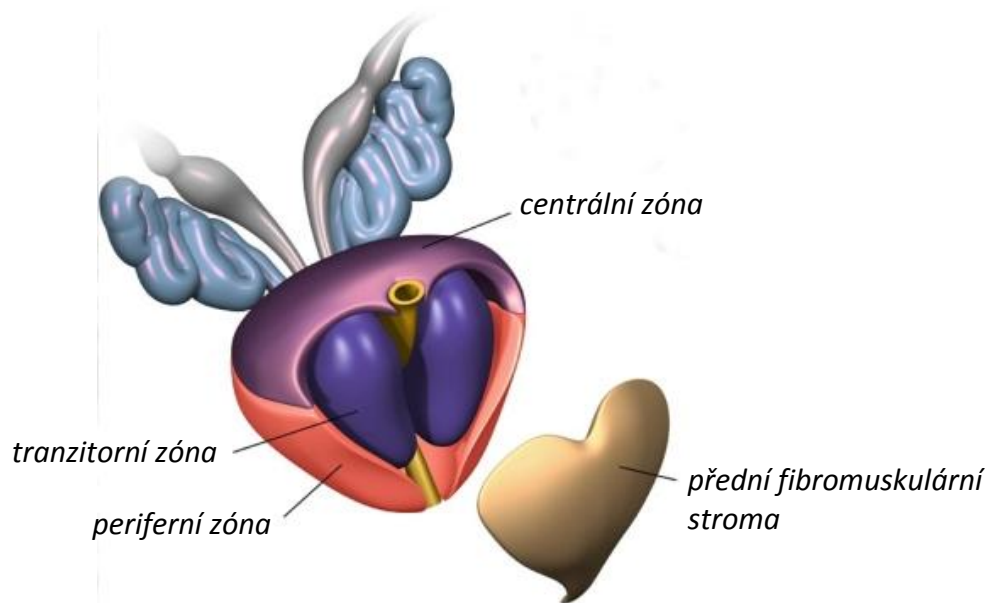
- » shromáždit dostatečně velký soubor bioptických vzorků prostaty od pacientů s diagnostikovaným karcinomem prostaty a pacientů s benigní prostatickou hyperplázií
- » provést izolaci mRNA ze vzorků
- » optimalizovat průběh reverzní transkriptázové PCR pro jednotlivé geny
- » změřit expresi všech genů v každém vzorku
- » statistickou analýzou určit případný rozdíl exprese každého genu mezi kontrolní skupinou a skupinou pacientů s karcinomem prostaty a nalézt možné korelace mezi expresí genů a klinickými daty pacientů

3 Přehled literatury

3.1 Anatomie a fyziologie prostaty

Prostata neboli předstojná žláza je přídatnou žlázou mužského pohlavního ústrojí. Má tvar komolého, předozadně zploštělého kužele. Obvyklá velikost žlázy je 2x3x4 cm, váží 20 - 40 g. Svou bází prostata přiléhá zespodu k močovému měchýři a prochází jí tzv. prostatická část močové trubice. Obklopuje ji vazivové pouzdro (Weiss, 2010).

Z anatomického pohledu lze prostatu rozdělit na tři zóny - centrální, periferní a tranzitorní zónu (tvořeny žlázovým epitelem odlišného typu dle jednotlivých zón) a na přední fibromuskulární stroma (tvořeno hladkou svalovinou a vazivem) - viz obrázek č.1. Periferní a centrální zóna jsou souhrnně označovány jako zevní oblast prostaty a zde se vyskytuje až 80% všech případů karcinomů prostaty (KP). Jako vnitřní oblast prostaty je označováno fibromuskulární stroma společně s tranzitorní zónou a je to oblast nejčastějšího výskytu benigní prostatické hyperplázie (Rajal a Zhou, 2012).



Obrázek č.1: Anatomie prostaty (Rajal a Zhou, 2012; upravené)

Hlavní fyziologickou funkcí prostaty je produkce tzv. prostatického sekretu, který následně tvoří až 30% ejakulátu a umožňuje nebo zvyšuje šanci na úspěšné oplodnění. Sekret prostaty je kyselý (pH=6,4) a obsahuje mj. řadu enzymů (kyselá fosfatáza, proteázy), citrát

(funkce pufru), prostaglandiny (napomáhají pohybu spermií stimulací svaloviny dělohy), polyamin spermin (důležitý pro motilitu spermií a jejich schopnost oplodnit vajíčko), zinek, fibrylizyn a prostatický specifický antigen (PSA). Prostata je stejně jako ostatní přídatné pohlavní žlázy senzitivní na hormony. Testosteron je pomocí 5- α -reduktázy přeměňován ve stromatu na účinnější dihydrotestosteron (DHT). Ten následně ovlivňuje činnost žlázových epitelů prostaty a udržuje tím funkčnost prostaty (Čihák, 2002).

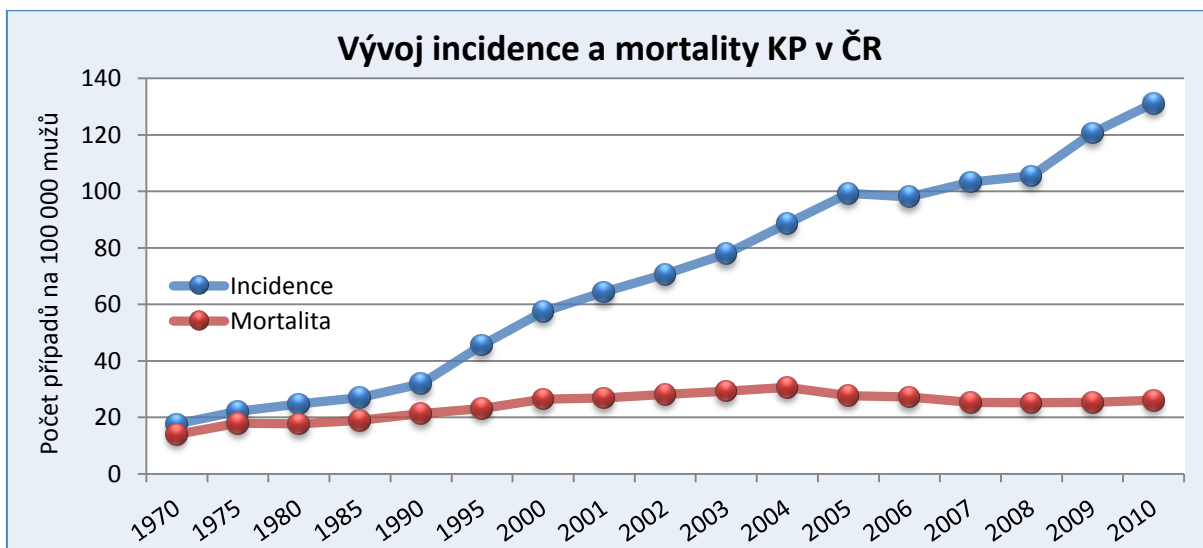
3.2 Karcinom prostaty

3.2.1 Epidemiologie

V České republice je od roku 2005 karcinom prostaty nejčastěji diagnostikovaným zhoubným nádorem u mužů (s výjimkou diagnózy "jiný zhoubný novotvar kůže" - tato diagnóza se však do onkologických statistik většinou nezahrnuje, aby nezkreslovala celkové výstupy a to vzhledem k relativně nízké úmrtnosti na tento typ diagnózy). V roce 2010 bylo hlášeno 6 771 nových případů KP (o 10 % více než v roce 2009), v přepočtu se jednalo o 131,2 případů na 100 000 mužů (viz graf č.1). Druhým nejčastěji diagnostikovaným novotvarem u mužů byl v roce 2010 karcinom tlustého střeva - 2 864 nových případů (55,5 případů na 100 000 mužů). Vyšší incidenci než KP neměl ani nejčastější novotvar diagnostikovaný u žen, tj. karcinom prsu - 6 498 nových případů (121,3 případů na 100 000 žen). Rapidní nárůst incidence KP je v ČR pozorován od počátku 90. let s další akcelerací po roce 2000. Tento nárůst je vysvětlován jednak stárnutím populace, jednak nárůstem rutinního preventivního vyšetřování hodnot prostatického specifického antigenu (PSA) u starších mužů. Díky tomu jsou odhalena i časná stádia KP, která se prozatím nijak klinicky nemanifestovala.

Míra standardizované úmrtnosti na KP od roku 2004 dlouhodobě klesá, přesto v roce 2010 oproti roku 2009 stoupla z 25,3 na 26,1 zemřelých na 100 000 mužů (viz graf č.1). Karcinom prostaty se tím řadí na druhé místo (za karcinom průdušek a plic) v žebříčku novotvarů u mužů dle mortality.

Relativní pětileté přežití po diagnóze KP dosahovalo u pacientů diagnostikovaných mezi roky 2001- 2005 hodnoty 83,3 % (oproti 79,1 % za období 2000-2004), to dokumentuje nárůst nově diagnostikovaných případů s benigním průběhem (ÚZIS, 2012).

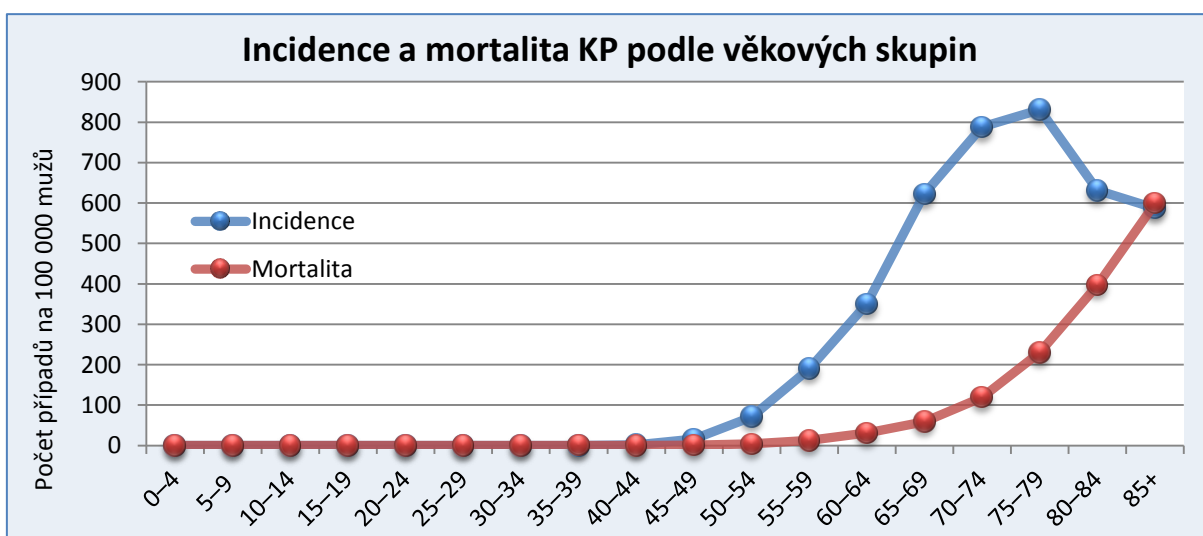


Graf č.1: Časový vývoj incidence a mortality diagnózy karcinom prostaty v ČR (data ÚZIS, zpracování vlastní)

3.2.2 Rizikové faktory

Příčiny vzniku karcinomu prostaty nejsou stejně jako u většiny nádorů přesně známy. Vliv na klinický projev KP má řada rizikových faktorů, mezi nejvýznamnější patří věk, rasová příslušnost a familiární výskyt KP.

Nejrizikovějším faktorem KP je věk. Incidence KP je ve skupině mužů do zhruba 50 let prakticky nulová, se zvyšujícím se věkem však prudce stoupá (viz graf č.2). Ve vyspělých zemích lze vysledovat posun incidence KP v posledních desetiletích do mladších věkových skupin vlivem vyšetřování PSA a lepší informovanosti o nemoci.



Graf č. 2: Incidence a mortalita diagnózy karcinom prostaty v ČR v roce 2010 podle věkových skupin (data ÚZIS, zpracování vlastní)

Rozdíly v incidenci a mortalitě KP na základě rasové příslušnosti lze prokázat ze statistik v rámci USA díky jejich pestrému etnickému složení. Průměrná incidence KP v USA byla na základě dat z let 2006 - 2010 152 případů na 100 000 mužů. Nejnižší incidence (77,8 případů / 100 000 mužů) byla v rámci populace domorodých Indiánů. Naopak nejvyšší incidence byla zaznamenána u příslušníků negroidní rasy - 228,5 případů / 100 000 mužů. Obdobné rozdíly panují i v mortalitě - nejvyšší je opět u negroidní rasy (50,9 případů / 100 000 mužů), naopak nejnižší mortalita je mezi potomky asijských a oceánských přistěhovalců (10,1 případů / 100 000 mužů) (Howlader *et al.*, 2013).

Familiární karcinom prostaty (5-6 % všech KP) znamená zvýšený výskyt tohoto onemocnění u mužských členů jedné rodiny. Tím stoupá relativní riziko onemocnění KP pro mužské příbuzné prvního stupně postiženého a familiární KP tvoří velkou část případů KP u pacientů do 56 let. Zároveň se potvrzuje autozomálně dominantní dědičnost tohoto onemocnění (Verhage *et al.*, 2001). Podtypem familiárního KP je hereditární karcinom, který je definován výskytem KP ve třech po sobě jdoucích generacích, postižením tří nebo více příbuzných prvního stupně a nebo postižením dvou mužů ve věku do 55 let v jedné rodině (Dvořáček a Babjuk, 2005).

Za jeden z rizikových faktorů jsou často považovány i androgeny. Ty mají zásadní vliv na normální růst a funkci prostaty a předpokládalo se, že zvýšená hladina androgenů s sebou může nést vyšší riziko rozvoje KP. Bylo provedeno mnoho studií, jejichž výsledky však byly často konfliktní, některé však poukazovaly na vyšší riziko KP např. při vysokém plazmatickém poměru testosteronu a dihydrotestosteronu nebo při vysoké hladině cirkulujícího testosteronu. Mezinárodní skupina vědců poté provedla analýzu všech předchozích prospektivních studií na toto téma, ale nenalezla žádnou asociaci mezi hladinou androgenů a rizikem KP (Roddam *et al.*, 2008).

Další možné rizikové faktory jsou hledány v oblasti výživy. Masko *et al.* (2013) analyzovali data z dříve provedených studií na různé výživové komponenty a jejich případný vliv na rozvoj KP. Tyto studie opět poskytovaly často rozporuplné výsledky, např. u vitamínu A a D, resveratrolu nebo konzumace masa. Pozitivní vliv měly nízkosacharidové a nízkotučné diety ve studiích na zvířecích modelech, u člověka se toto prokázat nepodařilo. Snížené riziko vzniku KP bylo prokázáno při konzumaci zeleniny a sóji (obsahuje fytoestrogeny), vliv na zpomalení růstu nádoru má konzumace Omega-3 mastných kyselin. Naopak nadměrná konzumace Omega-6 mastných kyselin zvyšuje riziko KP.

3.2.3 Patologie prostaty

Benigní hyperplazie prostaty (BPH) je nejčastějším benigním nádorem u mužů vyššího věku. Dochází k proliferaci epiteliálních a stromálních buněk především v tranzitorní zóně prostaty a tím ke zvětšení celé žlázy. Klinicky se může projevovat mikčními symptomy dolních cest močových. Incidence BPH vzrůstá s věkem - u 30letých mužů se objevuje zhruba v 10 % případů, u mužů ve věkové skupině 70-80 let je objevena v 80-90 % případů. Přesná etiologie BPH není známa, kromě rostoucího věku má velký vliv působení androgenů, především DTH (Wein *et al.*, 2012).

Mezi prostatické prekancerózy se řadí prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN). Je charakterizována jako cytologická atypie povrchové epiteliální vrstvy v prostatických duktech a acinech. Dělí se na dvě subkategorie - PIN nízkého stupně diferenciaci (low grade PIN) a PIN vysokého stupně diferenciaci (high grade PIN - HG-PIN) (Dvořáček a Babjuk, 2005). Souvislost mezi PIN (především HG-PIN) a KP je založena na společné vzrůstající incidenci s věkem pacientů, a předpokládá se, že HG-PIN předchází rozvoji KP přibližně o 10 let. Zároveň je HG-PIN nalézáno téměř u tří čtvrtin pacientů s KP a tyto nálezy jsou situovány do periferní zóny prostaty, kde se následně nachází většina KP. HG-PIN je možno diagnostikovat pouze na základě biopsie a následného histologického vyšetření (Bostwick *et al.*, 2004).

Jednoznačně nejčastějším typem diagnostikovaného KP je acinární adenokarcinom, který vzniká z epiteliálních buněk prostatických acinů. Nejčastěji je lokalizován do periferní zóny prostaty, kde se vytváří drobná nažloutlá kompaktní ložiska. Zásadní význam pro potvrzení malignity má nález chybějících bazálních buněk. Dalšími znaky potvrzující malignitu je nález infiltrativního růstu (nejčastěji perineurální šíření) a nádorové invaze (intravaskulární nebo přes pouzdro prostaty do tukově vazivových tkání). Kromě acinárního adenokarcinomu se vyskytují i další varianty prostatického karcinomu, které jsou však velmi vzácné (tvoří pouze jednotky procent všech adenokarcinomů nebo byly popsány jen u několika desítek pacientů) a svou biologickou povahou se odlišují od acinárního adenokarcinomu. Mezi varianty KP patří např. duktální adenokarcinom (v periuretrálních prostatických vývodech), mucinózní karcinom (tvořen masami hlenu), karcinom z prsténčitých buněk, neuroendokrinní karcinom, adenoidně bazocelulární karcinom, sarkomatoidní karcinom nebo karcinom z přechodného epitelu (Dvořáček a Babjuk, 2005).

3.2.4 Symptomy karcinomu prostaty

Karcinomy prostaty jsou nádory s širokou škálou chování - od naprosto benigních nádorů, přes nádory s pomalým růstem až po velmi agresivní metastazující typy. Latentní (preklinický) karcinom prostaty je definován jako histologicky detekovatelný, ale klinicky němý nádor. Latentní nádory jsou objeveny při pitvě asi u třetiny mužů nad 45 let a až u 80 % mužů ve věku 80 let, kteří zemřeli z jiné příčiny než je KP.

Symptomatický (klinický) nádor již způsobuje pacientovi obtíže. Mezi ně mohou patřit obstrukční příznaky (způsobené kompresí prostatické uretry rostoucím nádorem), iritační obtíže, hematurie, bolestivost za sponou stydkou a při již metastazujícím KP se mohou dostavit bolesti pánve a lumbosakrální části páteře, otok končetin, zduření lymfatických uzlin i patologické fraktury. V současné době jsou však díky testování hladiny PSA zachycovány KP v raném stádiu a u velké části nově diagnostikovaných pacientů ještě nedošlo ke klinickým projevům KP (Dvořáček a Babjuk, 2005).

3.2.5 Diagnostika karcinomu prostaty

Mezi hlavní nástroje diagnostiky KP patří rektální vyšetření, měření hladiny PSA a biopsie s následným histologickým vyšetřením.

Rektální vyšetření je palpační vyšetření prostaty přes konečník, kdy jsou hledány případné změny v konzistenci či tvaru žlázy.

Prostatický specifický antigen je nejvýznamnějším používaným markerem KP. Senzitivita PSA je ve vztahu k detekci KP uváděna mezi 68-80% a specifita mezi 49-90%. PSA je glykoprotein, který primárně produkují epiteliální buňky prostatických acinů a ductů. PSA tedy není specifický pouze pro nádorové buňky, ale produkuje ho zdravá tkáň i tkáň při BPH. Rozdíl je však v produkční schopnosti těchto buněk a "průniku" PSA z těchto buněk do séra. Nejvyšší aktivitu v tomto ohledu mají právě nádorové buňky, proto se zvyšující se hladinou PSA stoupá riziko KP. Za normální hodnotu PSA se považuje < 4 ng/ml, hodnoty PSA mezi 4 a 10 ng/ml spadají do tzv. šedé zóny a měla by po nich následovat biopsie prostaty. Snaha zvýšit senzitivitu tohoto testu vedla k ustanovení odvozených parametrů PSA. Mezi ně patří věkově specifická stratifikace PSA, neboť byla zjištěna přímá závislost mezi věkem, velikostí prostaty a hladinou PSA. Hodnota normálního PSA byla odstupňována podle

věkových skupin, s cílem zvýšit senzitivitu tohoto testu zejména u mladších mužů. Další variantou testu je měření poměru volného a celkového PSA (volné PSA + PSA vázané v séru na α_1 -antichymotrypsin). U KP se zvyšuje poměr volné frakce PSA, což umožňuje odlišit KP od BPH. PSA velocita sleduje změnu hladiny PSA v časovém horizontu a opět umožňuje lepší odlišení KP od benigních změn prostaty. Stejný význam má i parametr PSA denzity, který je dán poměrem celkové hladiny PSA a objemu prostaty a tento poměr je signifikantně nižší u hyperplázií. Pro monitorování recidivity KP se používá zdvojovací čas PSA - časový interval, při kterém dojde ke zdvojnásobení hladiny PSA, přičemž kratší interval zvyšuje riziko recidivity. Další markery KP jsou uvedeny v tabulce č.1, jejich senzitivita je často větší než senzitivita PSA, ale v klinické praxi nejsou výrazněji používány (You *et al.*, 2010).

Při podezření na KP na základě výsledků rektálního vyšetření nebo vyšetření hladiny PSA následuje biopsie prostaty. Odebraný vzorek je histologicky vyšetřen, čímž se (ne)potvrdí diagnóza KP a poté může být zahájena samotná léčba KP (Dvořáček a Babjuk, 2005).

Zkratka	Název markeru	Typ markeru
A2M	alfa(2)-makroglobulin	diagnostický
Akt-1	serin/threonin kináza	prognostický
AMACR	alfa-methylacyl-koenzym-A	diagnostický a prognostický
DD3/PCA3	prostatický nádorový gen 3	diagnostický
EPCA	brzký prostatický nádorový antigen	diagnostický
GRN-A	granin-A	potencionálně diagnostický a prognostický
GSTP-1	enzym pro glutathion S-transferázu	diagnostický
HSP27	protein tepelného šoku	náhradní biomarker
Ki67	proliferační antigen	prognostický
KLK2	lidský kalikrein 2	prognostický
p53	nádorový supresorový gen	prognostický pro výsledek po radikální prostatektomii
PAP	prostatické kyselé fosfatázy	diagnostický
PIM-1	serin/threonin kináza	diagnostický a prognostický
PSA	prostatický specifický antigen	diagnostický a prognostický
PSCA	antigen prostatických kmenových buněk	progresivní biomarker
PSGR	prostatický specifický G-protein	diagnostický biomarker
PSMA	prostatický specifický membránový antigen	diagnostický biomarker
PSP94	prostatický sekreční protein	progresivní biomarker
PTGS2	prostaglandin H syntáza 2	diagnostický a prognostický
TMPRSS2	gen pro serin 2, transmembrální proteáza regulovaná androgenem	diagnostický biomarker
Trp-p8	přechodný potenciální receptor p8	diagnostický biomarker pro vysoký stupeň KP

Tabulka č.1: Markery specifické pro prostatu (You *et al.*, 2010)

3.2.6 Prognóza a terapie karcinomu prostaty

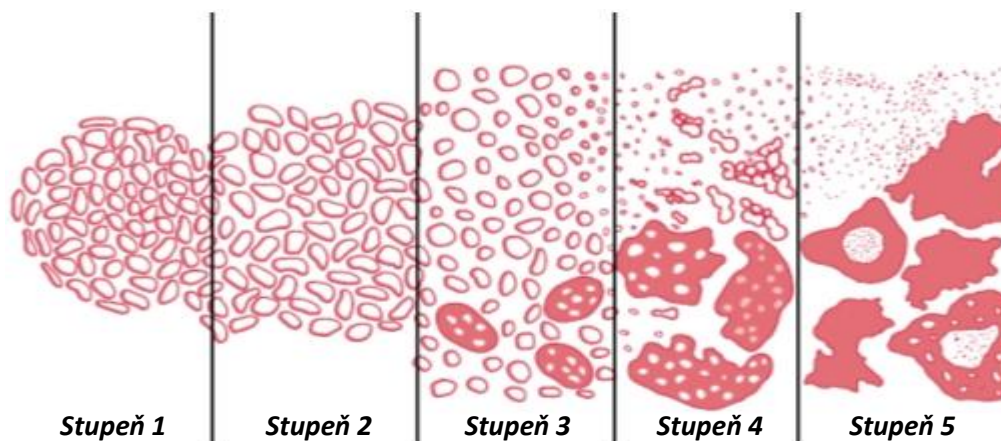
Pro určení vhodného způsobu léčby je nutné určit prognózu vývoje KP. K tomuto účelu se používá TNM klasifikace (staging - určení rozsahu onemocnění) a Gleasonovo skóre (grading - histologická diferenciací).

TNM klasifikace se určuje na základě rektálního vyšetření, použití zobrazovacích metod, hladiny PSA či biopsii prostaty. Klasifikace popisuje rozsah primárního nádoru (T - tumor), šíření nádoru do regionálních mízních uzlin (N - nodes) a případný výskyt vzdálených metastáz (M - metastasis). Popis jednotlivých stupňů je uveden v tabulce č.2.

T	Primární tumor
Tx	Primární tumor nelze hodnotit
T0	Žádný důkaz primárního tumoru
T1	Klinicky němý, nehmatný nebo pomocí vyšetření nezobrazitelný tumor
T1a	Histologický nález tumoru v < 5 % resekované tkáně
T1b	Histologický nález tumoru v > 5 % resekované tkáně
T1c	Tumor zjištěný punkční biopsií (při zvýšeném PSA)
T2	Tumor omezen na prostatu
T2a	Tumor infiltruje polovinu jednoho laloku nebo méně
T2b	Tumor infiltruje více než polovinu jednoho laloku, ale ne oba laloky
T2c	Tumor infiltruje oba laloky
T3	Tumor se šíří přes pouzdro prostaty
T3a	Extrakapsulární šíření (jednostranné nebo oboustranné)
T3b	Tumor prorůstá do jednoho nebo obou semenných váčků
T4	Tumor je fixovaný nebo prorůstá do okolních struktur (kromě semenných váčků): hrdla močového měchýře, zevního svěrače, zdvihačů dna pánevního, rekta, pánevní stěny
N	Regionální lymfatické uzliny
Nx	Regionální lymfatické uzliny nelze hodnotit
N0	Metastázy v regionálních lymfatických uzlinách nejsou přítomny
N1	Přítomnost metastáz v regionálních lymfatických uzlinách
M	Vzdálené metastázy
Mx	Přítomnost vzdálených metastáz nelze hodnotit
M0	Vzdálené metastázy nejsou přítomny
M1	Přítomnost vzdálených metastáz
M1a	Metastázy mimo regionální mízní uzlinu/y
M1b	Kostní metastázy
M1c	Metastázy v jiných orgánech

Tabulka č.2: TNM klasifikace karcinomu prostaty (Kawaciuk, 2009; upravené)

Při gradingu nádoru se na bioptickém vzorku vyhodnotí architektonické uspořádání nádorových žlázek na pětistupňové škále - od velmi dobře diferenciovaného nádoru (stupeň 1) až po zcela nediferenciovaný karcinom (stupeň 5). Ve vzorku jsou ohodnoceny dva nejčastěji se vyskytující nálezy (např. 3+4), součtem jejich stupňů se získá Gleasonovo skóre ($GS = 3+4 = 7$). Čím vyšší je Gleasonovo skóre, tím je prognóza pro pacienta horší (Kawaciuk, 2009). Zobrazení jednotlivých stupňů gradingu je na obrázku č.2.



Obrázek č.2: Jednotlivé stupně gradingu KP, z nichž se vypočítává Gleasonovo skóre (Rajal a Zhou, 2012; upravené)

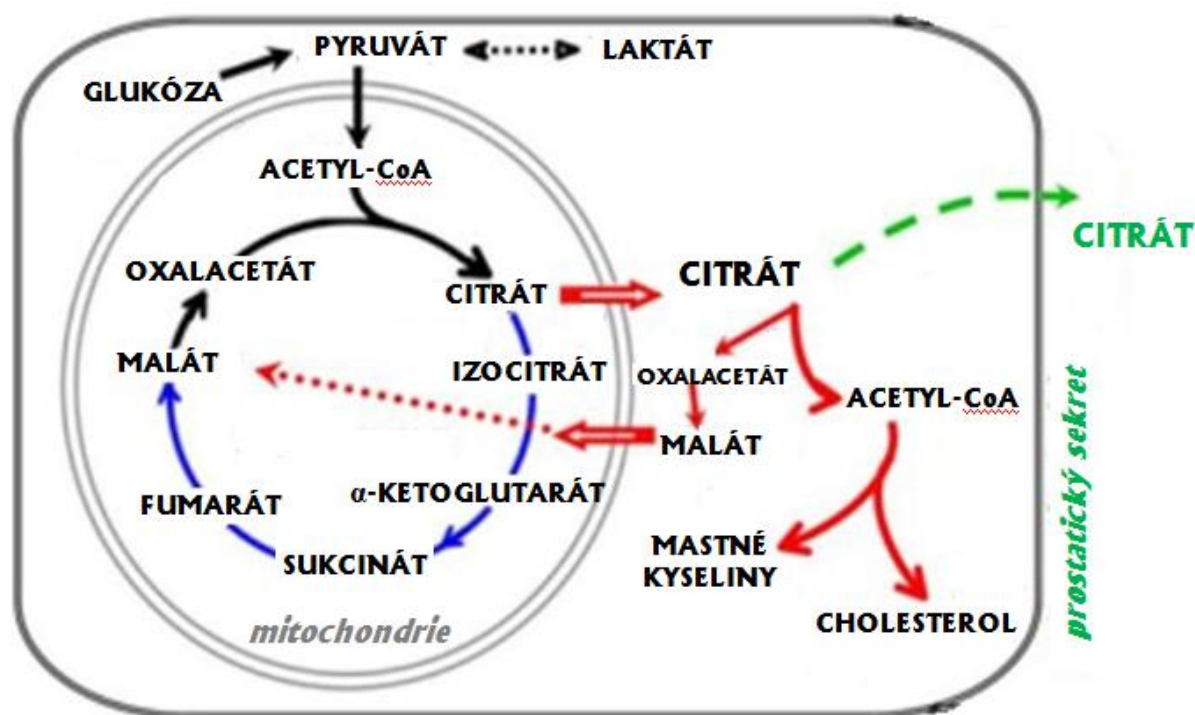
Nejběžnějším (a pro pacienta nepřijatelnějším) způsobem léčby KP je odložená léčba označovaná jako "pozorné vyčkávání" (watchful waiting). Pacient je v takovém případě sledován, v časových intervalech podstupuje kontrolní vyšetření a v případě progresu nádoru je zahájena aktivní léčba. Tento způsob léčby je vhodný pro starší pacienty (doporučováno při $GS \leq 6$, $PSA \leq 10$ ng/ml a očekávané době dožití < 10 let). Aktivní léčbu KP představuje radikální prostatektomie, kdy dojde ke kompletnímu odstranění prostaty včetně semenných váčků. Tato léčba je vhodná u pacientů s KP ohraničeným na prostatu ($\leq T3a$) a především u mladších pacientů, u kterých je očekávaná doba dožití delší jak 10 let a $GS \geq 8$. Další možností léčby je radikální radioterapie prostaty, opět častější u mladších pacientů, u kterých jsou například kontraindikace k operativnímu zákroku. Hormonální léčba je využívána převážně u pacientů, u kterých již nádor infiltroval do mizních uzlin nebo tvoří metastázy a použití předchozích typů léčby je tím nemožné nebo nedostatečné. Androgenní deprivace indukuje u prostatických buněk apoptózu. Androgenní deprivaci lze navodit oboustranným odstraněním varlat jako producentů testosteronu nebo pomocí léků např. ze skupiny antiandrogenů (kompetitivní inhibice androgenních receptorů). Při progresi karcinomu k hormonálně independentnímu KP je možnost léčit cytostatiky, toto stadium ale již má velmi špatnou prognózu (doba přežití cca 2 roky) (Heidenreich *et al.*, 2008).

3.3 Působení zinku v prostatických buňkách

Produkty všech čtyř genů analyzovaných v této práci se podílejí na regulaci zinku v prostatických buňkách, proto bude tato podkapitola věnována právě roli zinečnatých iontů v buňkách prostaty.

Zinek je esenciální prvek nutný pro život všech organismů, po železe je to druhý nejhojnější těžký kov v lidském těle. Až 10 % lidského genomu kóduje proteiny se schopností vázat zinek (Andreini *et al.*, 2006). Zinek dependentních enzymů je přibližně 300 a jsou zastoupeny ve všech třídách enzymů. Zinečnaté ionty plní v enzymech především roli katalyzační, kokatalyzační nebo strukturální nebo mohou enzymy inhibovat (McCall *et al.*, 2000). Proteiny váží zinek pomocí "zinkových prstů" (zinc fingers), sekvence bohaté na histidin a cystein (Maret a Li, 2009). Zinečnaté ionty ovlivňují buňky na mnoha úrovních, např. mohou inhibovat protein tyrosin fosfatázy, čímž aktivují kinázy regulující buněčný cyklus, diferenciaci, apoptózu apod. (Yamasaki *et al.*, 2007b).

V prostatických buňkách plní zinek unikátní roli. Funkcí prostatické žlázy (především její periferní zóny) je produkce prostatického sekretu. Ten má vysokou pufrací kapacitu, čímž umožňuje udržet pro spermie příznivé neutrální pH i v jinak kyselém prostředí ženských pohlavních orgánů. Jako pufr slouží citrát, který je v prostatickém sekretu obsažen v neobvykle vysoké koncentraci (Owen a Katz, 2005). Schopnost akumulovat a následně sekretovat citrát v takto vysokých koncentracích je unikátní vlastností prostatických buněk - viz tabulka č.3. V ostatních buňkách lidského těla je citrát meziproduktem Krebsova cyklu (neboli citrátového cyklu), na který mj. navazuje tvorba ATP sloužícího jako zdroj energie. V prostatických buňkách je ale Krebsův cyklus přerušen a citrát je jeho konečným produktem (viz obrázek č.3). To je zapříčiněno inhibicí mitochondriální akonitázy - enzymu, který v Krebsově cyklu katalyzuje přeměnu citrátu na izocitrát. A funkci inhibitoru akonitázy plní v prostatických buňkách právě zinek, který je zde rovněž akumulován ve vysokých koncentracích - viz tabulka č.3 (Costello a Franklin, 2009). Zinek ovlivňuje energetický metabolismus prostatických buněk i na úrovni terminální oxidace, kde má inhibiční vliv zejména na cytochrom bc1 komplex (komplex III) v dýchacím řetězci. Prostatické buňky tímto ztrácejí až 65 % energie oproti jiným buňkám. Tento deficit prostatické buňky kompenzují zvýšenou aerobní glykolýzou (Costello *et al.*, 2004).



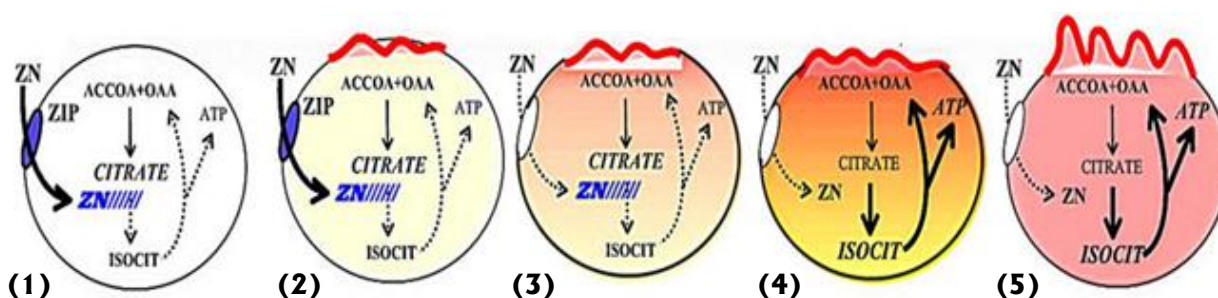
Obrázek č.3: Metabolické dráhy citrátu v savčích buňkách. Dráha syntézy citrátu označena černými šipkami, dráha oxidace citrátu v Krebsově cyklu označena modrými šipkami, dráha exportu citrátu a utilizace pro syntézu mastných kyselin/cholesterolu označena červenými šipkami. Sekreční dráha citrátu, která probíhá pouze v normálních prostatických buňkách, označena zelenými šipkami (Costello a Franklin, 2006; upraveno)

Vysoké koncentrace zinku a citrátu v prostatických buňkách zasahují také do regulace buněčného růstu a apoptózy. Zinečnaté ionty mohou indukovat tvorbu pórů ve vnější mitochondriální membráně. To umožňuje eflux cytochromu c z mitochondrií, který následně aktivuje kaskádu kaspáz vedoucí k apoptóze (Feng *et al.*, 2008). Citrát slouží v ostatních buňkách také jako prekurzor pro tvorbu cytoplazmatického acetyl-CoA, který stojí na počátku lipogeneze. Ta je nezbytná pro tvorbu buněčných membrán potřebných především při buněčném růstu (Costello a Franklin, 2000).

	Citrát (nmol g ⁻¹)	Zn (nmol g ⁻¹)
Zdravá tkáň periferní zóny prostaty	13 000	3000
Maligní tkáň periferní zóny prostaty	1000	500
BPH	14 000	4000
Prostatický sekret	90 000	9000
Prostatický sekret při KP	8000	1000
Ostatní tkáň v lidském těle	300	200
Krevní plazma	100	15

Tabulka č.3: Koncentrace citrátu a zinku v různých tkáních (Costello a Franklin, 2009).

Tato schopnost akumulovat zinek, resp. následně i citrát se však prokazuje pouze u buněk zdravé prostatické tkáně. U buněk karcinomu prostaty, jak lze vidět z tabulky č.3, jsou tyto koncentrace mnohonásobně nižší. Podle Costella a Franklina (2000) je právě tato ztráta schopnosti akumulovat zinek předpokladem k přechodu buněk do maligního stádia. Z "citrát-akumulujících" buněk se stanou buňky "citrát-oxidující". Z Krebsova cyklu získají maligní buňky potřebnou energii a z dráhy lipogeneze stavební jednotky pro biogenezi membrán při buněčném růstu (viz obrázek č. 4). Využití citrátu v těchto dvou metabolických drahách má za následek snížení jeho koncentrace v buňkách (a tím jeho sníženou sekreci).



Obrázek č.4: Role ZIP1, zinku a metabolismu citrátu v patogenezi karcinomu prostaty. Normální buňka (1) exprimuje ZIP1 a tím akumuluje zinek. Ten inhibuje akonitázu a vede k akumulaci citrátu, který snižuje produkci ATP. Genetickou transformací je snížena exprese ZIP1 (3) a hladina zinku v buňce klesá, čímž je zrušen inhibiční efekt na akonitázu. Krebsův cyklus je funkční a roste produkce ATP (4). Buňka získává energii na manifestaci svého maligního potencionálu a odstranění inhibičního vlivu zinku na proliferaci umožňuje její růst a progresi (vysvětlivky: isocit- izocitrát, ACCOA-acetylCoA, OAA-oxalacetát) (Franklin *et al.*, 2005; upraveno)

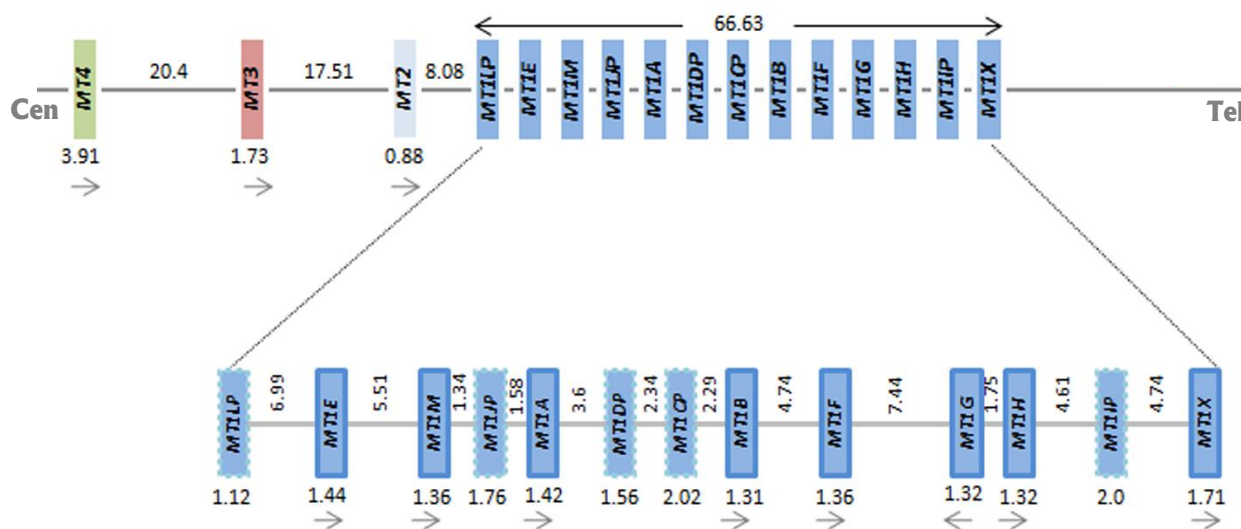
Předpokladem změny metabolismu citrátu v prostatických nádorových buňkách je již zmiňovaná ztráta schopnosti akumulovat zinek. Za to by mohly být odpovědné skupiny proteinů regulující jeho hladinu v buňce. Zinečnaté ionty nemohou volně procházet přes plazmatickou membránu, k jejich přenosu je zapotřebí transportérů. Zinkové transportéry se dělí na dvě skupiny - ZIP ("ZRT/IRT-like proteins") a ZnT ("zinc transporters"). ZIP zabezpečují import zinečnatých iontů do cytoplazmy buněk a to buď z vnějšího prostředí (intersticiální tekutiny) nebo z buněčných organel. Opačným směrem - z cytoplazmy do okolí buněk nebo do buněčných organel transportují zinečnaté ionty ZnT (Kambe *et al.*, 2004). V cytoplazmě jsou zinečnaté ionty navázány především na metalothioneiny (MT), v menší míře na aminokyseliny a organické kyseliny (citrát), volné zinečnaté ionty se v cytoplazmě vyskytují jen ve velmi nízké koncentraci (Coyle *et al.*, 2002). A právě exprese dvou zástupců rodiny ZIP transportérů a dvou metalothioneinů byly analyzovány v této práci.

3.4 Analyzované geny

3.4.1 Metalothioneiny - MT1-F a MT2

Metalothioneiny jsou skupina proteinů poprvé izolovaných před téměř 60 lety jako kadmium-vázající proteiny z tkáně koňských ledvin (Margoshes a Vallee, 1957). Následně byly objeveny a studovány i u dalších skupin organismů - prokaryot, rostlin, bezobratlých i obratlovců. Seznam funkcí metalothioneinů v organismu se stále rozrůstá, mezi hlavní ale patří detoxifikace buněk od těžkých kovů a udržování homeostaze iontů těžkých kovů. Tím ovlivňují také buněčný cyklus, proliferaci, angiogenezi, imunitní odpověď atd. (Coyle *et al.*, 2002).

U savců byly identifikovány čtyři izoformy metalothioneinů - MT1, MT2, MT3 a MT4. U člověka jsou všechny geny MT lokalizovány na chromosomu 16 (16q13). Geny pro MT2, MT3 a MT4 se vyskytují pouze v jedné kopii. Gen pro MT1 byl v průběhu evoluce několikrát duplikován, v lidském genomu nalezneme osm aktivních genů (MT1-A, -B, -E, -F, -G, -H, -M, -X) a pět pseudogenů (MT1-C, -D, -I, -J, -K) - viz obrázek č.5. Metalothioneiny MT1 a MT2 jsou exprimovány ve všech lidských tkáních, zbylé dvě izoformy jsou spíše tkánově specifické - MT3 je exprimován v nervových buňkách, MT4 v určitých typech epitelových buněk (Moleirinho *et al.*, 2011).

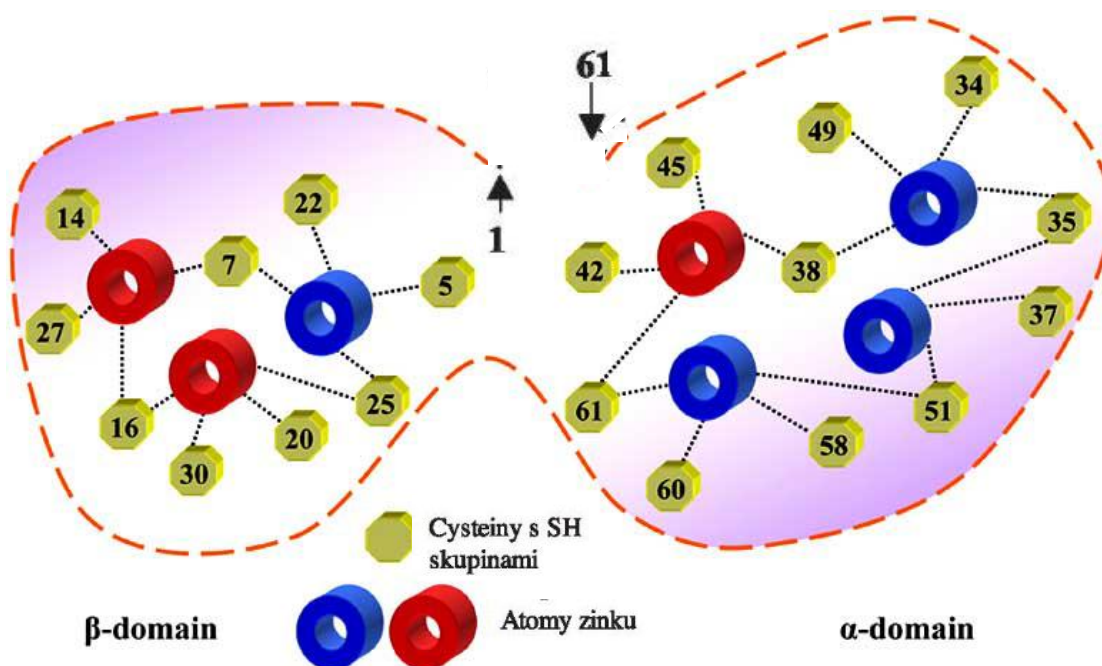


Obrázek č.5: Uspořádání lidských MT genů na 16. chromosomu. Aktivní geny MT1 ohraničeny rovnou linkou, pseudogeny MT1 ohraničeny tečkovaně. Čísla představují vzdálenosti velikosti genů, resp. intergenovým oblastem (udáno v kb), šipky označují směr transkripce (Moleirinho *et al.*, 2011; upraveno)

Savčí MT jsou nízkomolekulární proteiny (6-7 kDa). Jednořetězcové polypeptidy jsou tvořeny 61 až 68 aminokyselinami, neobsahují žádné aromatické AK. Naopak třetinu AK tvoří cysteiny, které jsou konzervovány v repeticích C-X-C, C-C-X-C-C, C-X-C-C (kde X je jiná AK než cystein). Metalothioneiny mají dvě téměř stejně velké globulární domény oddělené krátkým úsekem bez cysteinu. Obě domény - α i β doména obsahují repetice Cys, jejichž thiolové skupiny jsou odpovědné za vazbu těžkých kovů (viz obrázky č.6 a č.7). N-terminální β doména je schopná vázat tři dvoumocné kationty těžkých kovů, C-terminální α doména má čtyři vazebná místa. Jedna molekula MT je tedy schopná najednou navázat 7 dvoumocných kationtů, v případě jednomocných kationtů mohou vázat až 12 kationtů (Coyle *et al.*, 2002). Metalothioneiny nejčastěji váží kationty Zn^{2+} , ty však mohou být nahrazeny jinými kationty s větší afinitou - Pb^{2+} , Cu^{+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{+} nebo Pd^{2+} , naopak menší afinitu mají kationty Fe^{2+} a Fe^{3+} (Babula *et al.*, 2012). Vazba kationtů je nutná pro stabilitu metalothioneinů - molekuly bez navázaných kationtů jsou nestabilní a velmi rychle degradované, po vazbě zinečnatých kationtů mají poločas rozpadu zhruba 30 hodin (Klaassen *et al.*, 1994). Metalothioneiny se vyskytují intra- i extracelulárně. V buňce se nachází zejména v cytoplazmě a organelách (mitochondrie, lysozomy). V případě oxidativního stresu nebo v průběhu rané S-fáze buněčného cyklu jsou translokovány do jádra. Vzhledem ke své velikosti mohou volně procházet jadernými póry (Penkowa, 2006).

MDPNCSCAT-GGSCTCTGSCCKCKECKCTSCCKSCCSCCPMSCAKCAQGCICKGAS-----EKCSCCA	MT1A
MDPNCSTT-GGSCACAGSCCKCKECKCTSCCKSCCSCCPVGCAKCAQGCVCCKGSS-----EKCRCCA	MT1B
MDPNCSCA-TGGSCTCAGSCCKCKECKCTSCCKSCCSCCPVGCAKCAQGCVCCKGAS-----EKCSCCA	MT1E
MDPNCSCA-AGVSCTCAGSCCKCKECKCTSCCKSCCSCCPVGCSKCAQGCVCCKGAS-----EKSCCDD	MT1F
MDPNCSCAAAGVSTCASSCKCKECKCTSCCKSCCSCCPVGCAKCAQGCICKGAS-----EKCSCCA	MT1G
MDPNCSCA-GGSACAGSCCKCKCKCTSCCKSCCSCCPLGCAKCAQGCICKGAS-----EKCSCCA	MT1H
MDPNCSTT-GVSCACTGSCCTCKECKCTSCCKSCCSCCPVGCAKCAHGCVCKGTL-----ENSCCCA	MT1M
MDPNCSCSPV-GSCACAGSCCKCKECKCTSCCKSCCSCCPVGCAKCAQGCICKGTS-----DKSCCCA	MT1X
MDPNCSCA-AGDSCTCAGSCCKCKECKCTSCCKSCCSCCPVGCAKCAQGCICKGAS-----DKSCCCA	MT2
MDPETCPGPSGGSTCADSCCKEGCKCTSCCKSCCSCCPAECEKCAKDCVCKGGEAAEAEEKSCCQ	MT3
MDPREVCMSGGICMCGDNCKCTTCNCKTYWKSCCPCCPPGCAKCAARGCICKGGS-----DKSCCPC	MT4
. . * * . * * * : * : * : * . ** * * **** : * : **** : : * **	

Obrázek č.6: Primární sekvence jednotlivých izoforem metalothioneinů a jejich porovnání. Modře vyznačeny konzervované repetice cysteinů (zdroj: UniProt)



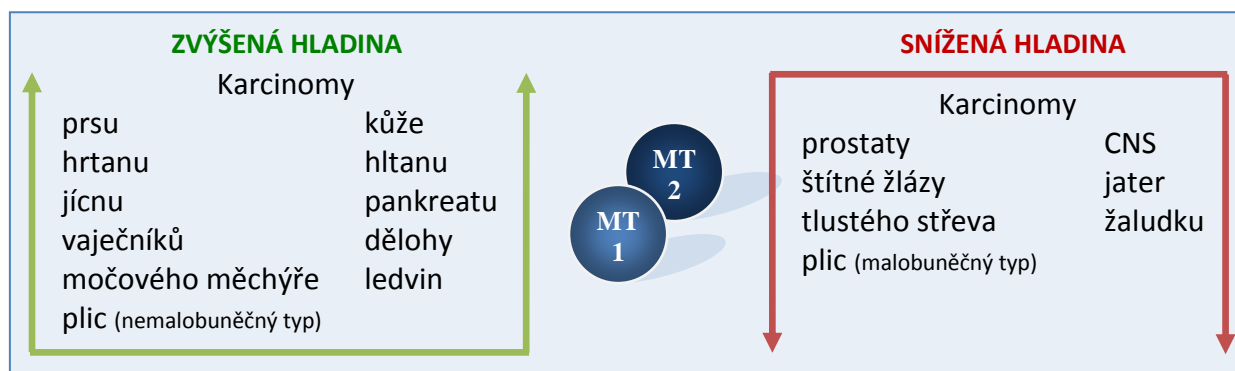
Obrázek č.7: Model struktury metalothioneinů (Eckschlager *et al.*, 2009; upravené)

V této práci byly zkoumány exprese genů MT1 (konkrétně izoformy MT1-F) a MT2, proto se v další části kapitoly zaměřím na tyto dvě izoformy. Transkripce těchto dvou forem může být aktivována řadou stimulů. Hlavním stimulantem exprese jsou ionty zinku a kadmia. Po navázání na MTF-1 (metal-regulatory transcription factor-1) se tento transkripční faktor váže v oblasti promotoru MT genů na MRE element (metal responsive element) a stimuluje tím expresi MT (Miles *et al.*, 2000). Dalším možným stimulantem jsou hormony glukokortikoidy, které působí na element promotoru GRE (glucocorticoid response element). V promotoru se nachází také element ARE (antioxidant response element), který je stimulován volnými radikály. Expresi MT zvyšují také cytokiny, zejména interleukin-6 (Haq *et al.*, 2003).

Metalothioneiny váží ionty těžkých kovů, čímž slouží jako rezervoáry těchto kovů pro syntézu např. zinek-dependentních enzymů. Rovněž slouží k detoxikaci buněk tím, že těžké kovy (např. kadmium) transportují do ledvin, kde jsou vylučovány. Společně s antioxidantem glutathionem pomáhají snižovat hladinu volných radikálů v buňce a tak ji chránit před jejich negativním působením (Miles *et al.*, 2000). Metalothioneiny bez navázaných kationtů kovů mohou vyvazovat transkripční faktor p53. Tím zabrání své degradaci a především znemožní p53 fungovat jako transkripční faktor, tím ovlivňují buněčnou proliferaci (Ostrakhovitch *et al.*, 2006). Zasahují rovněž do regulace apoptózy, jejich zvýšená hladina reguluje aktivitu a

lokalizaci transkripčního faktoru NF- κ B, který funguje jako aktivátor antiapoptotických genů (Formigari *et al.*, 2007). Metalothioneiny mohou rovněž modulovat imunitní odpověď a zároveň tím působit protektivně. V buňkách centrální nervové soustavy redukuje syntézu prozánětlivých mediátorů a zároveň zvyšují expresi protizánětlivých a regenerativních faktorů (např. interleukin-10; nervový, fibroblastový a vaskulární endoteliální růstový faktor), čímž brání poškození nervové tkáně zánětlivými procesy (Penkowa, 2006).

V posledních desetiletích se studium metalothioneinů zaměřuje na jejich roli v kancerogenezi. Je zkoumána především exprese a hladina MT1 a MT2 v souvislosti s různými typy karcinomů. Prokázalo se, že v některých typech karcinomů je hladina MT snížena a u jiných typů je naopak signifikantně vyšší (viz obrázek č.8). U řady z nich se také prokázala pozitivní či negativní korelace s vyššími stupni gradingu či stagingu tumoru. To staví metalothioneiny do role potencionálních onkomarkerů (Pedersen *et al.*, 2009). U karcinomu prostaty byla zjištěna snížená hladina MT1 a MT2. To prokázali Wei *et al.* (2008), hladina metalothioneinů v buněčných liniích odvozených od buněk karcinomu prostaty byla oproti nemaligní buněčné linii snížena o 95 % a v odebraných vzorcích karcinomu o 73 % oproti kontrolám. Kromě hladiny proteinů je zkoumána i exprese jednotlivých izoform a bylo zjištěno, že jejich exprese může být zároveň zesílena i zeslabena v jednom typu tumoru (Pedersen *et al.*, 2009). Garrett *et al.* (2000) se ve své práci zabývali expresním profilem buněk zdravé prostatické tkáně a detekovali expresi izoform MT1-A, MT1-E, MT1-F, MT1-X a MT2, naopak se jim nepodařilo prokázat expresi izoform MT1-B, MT1-G a MT1-H. V buněčných liniích karcinomu prostaty zjistili Garrett *et al.* (2000) sníženou expresi MT1-E a MT1-X v porovnání s nemaligní tkání. Ke stejnému poznatku dospěli i Henrique *et al.* (2005) v případě MT1-G (který tím zároveň potvrdil expresi MT1-G v prostatických buňkách) a Yamasaki *et al.* (2007a) v případě MT1-A. Naopak Gumulec *et al.* (2012) zjistili zvýšenou expresi izoform MT1-A a MT2 a zároveň sníženou hladinu MT v buněčných liniích karcinomu prostaty v porovnání s normální linií a také zvýšenou hladinu MT v séru pacientů s KP oproti souboru kontrol. Na základě toho vyvozují, že by metalothioneiny mohly být ve zvýšené míře transportovány z buněk karcinomu prostaty do extracelulárního prostředí.



Obrázek č.8: Změna hladiny proteinů MT1 a MT2 v různých typech karcinomu (údaje z Pedersen *et al.*, 2009)

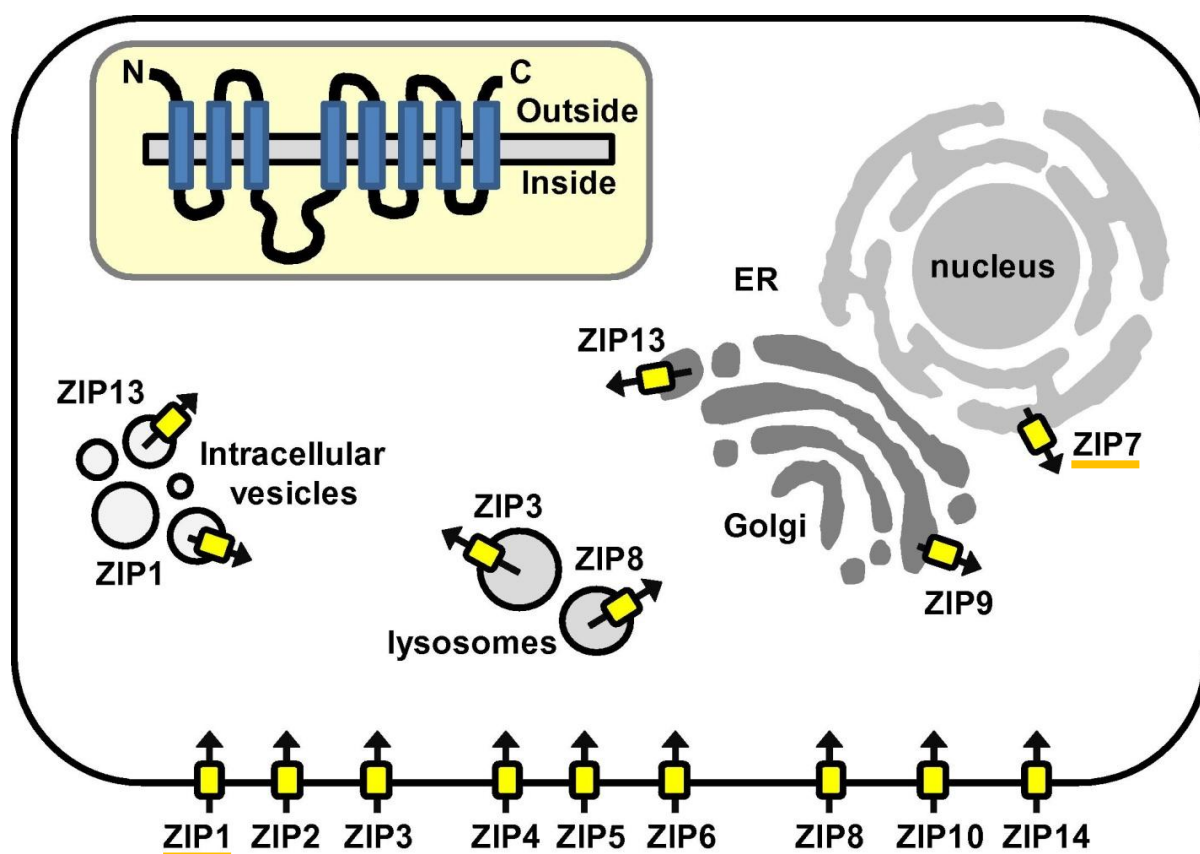
3.4.2 Zinkové transportéry - ZIP1 a ZIP7

Jak již bylo zmíněno, hladina zinku je v buňkách korigována dvěma skupinami transportérů. ZnT ("zinc transporters") umožňují eflux zinečnatých kationtů z cytoplazmy do okolí buňky. Geny zkoumané v této práci patří do druhé skupiny - tzv. ZIP transportéry ("ZRT/IRT-like proteins"). Ty zabezpečují import zinečnatých iontů do cytoplazmy buněk a to buď z vnějšího prostředí, nebo z buněčných organel.

Tato rodina proteinů je pojmenována podle svých prvních identifikovaných členů - proteinů ZRT1 a ZRT2 u *Saccharomyces cerevisiae* a IRT1 u *Arabidopsis thaliana*, objevených před necelými 20 lety. Členy této rodiny nalezneme ve všech skupinách živých organismů - u prokaryot (bakterie i archae) i eukaryot (houby, rostliny, živočichové) (Kambe *et al.*, 2004).

U člověka bylo identifikováno 14 ZIP transportérů rozdělených dle fylogenetické příbuznosti do 4 skupin - podrodiny I a II, LIV-1 a gufA. V této práci analyzovaný ZIP1 patří do podrodiny II, ZIP7 náleží do podrodiny LIV-1. Transportéry jsou umístěny jednak na cytoplazmatické membráně - např. ZIP1, a jednak na membránách řady buněčných organel - např. ZIP7 na membráně endoplazmatického retikula (viz obrázek č.9). Transportéry mají osm transmembránových domén, N- a C-konce proteinu směřují vně buňky (viz obrázek č.9). Mezi třetí a čtvrtou transmembránovou doménou se nachází dlouhá smyčka se sekvencí bohatou na histidin, předpokládá se, že hraje roli ve vazbě iontů těžkých kovů a regulace transportu. Transmembránové domény čtyři a pět jsou amfipatické a právě mezi nimi pravděpodobně vzniká kanál pro průchod zinečnatých kationtů. Podrodina LIV-1 se od ostatních členů odlišuje přítomností konzervovaného metaloproteinázového motivu

(HEXPHEXGD) na oné dlouhé smyčce, histidin bohatou sekvencí na N-konci a prodlouženou smyčkou mezi druhou a třetí transmembránovou doménou. Transportéry lze nalézt v buňkách většiny tkání, ale některé jsou částečně tkáňově specifické (viz tabulka č.4). Pravděpodobným způsobem transportu zinečnatých kationtů je jejich symport s dvěma molekulami HCO_3^- (Jeong a Eide, 2013).



Obrázek č.9: Umístění jednotlivých členů rodiny ZIP transportérů, kteří zajišťují transport zinečnatých iontů do cytoplazmy. V této práci byly analyzovány exprese genů ZIP1 a ZIP7. Ve výřezu nákres struktury ZIP transportérů, které jsou tvořeny osmi transmembránovými doménami (Jeong a Eide, 2013).

ZIP	Typ	Ionty	Tkáňové umístění	Umístění v buňce	Asociace s nemocemi
ZIP1	II	Zn	široce rozšířené	PM, transportní váčky	karcinom prostaty, neurodegenerace
ZIP2	II	Zn	široce rozšířené	PM	
ZIP3	II	Zn	široce rozšířené	PM, lysozomy	neurodegenerace
ZIP4	LIV-1	Zn	trávicí trakt, ledviny, hypofýza	PM, lysozomy, apikální strana enterocytů	karcinom jater a pankreatu
ZIP5	LIV-1	Zn	pankreas, ledviny, játra, žaludek, střevo	PM, basolaterální strana enterocytů	
ZIP6	LIV-1	Zn	široce rozšířené	PM	karcinom prsu, prostaty, pankreatu, neuroblastom
ZIP7	LIV-1	Zn, Mn	široce rozšířené	ER, Golgiho aparát	karcinom prsu
ZIP8	LIV-1	Zn, Cd, Mn	široce rozšířené, T-buňky, testis	PM, lysozomy, mitochondrie	zánět, karcinom prsu
ZIP9	I			trans-Golgi	
ZIP10	LIV-1	Zn	mozek, játra, ledviny	PM	karcinom prsu
ZIP11	gufA				
ZIP12	LIV-1	Zn	mozek, plíce, testis, sítnice		
ZIP13	LIV-1	Zn	široce rozšířené	transportní váčky, Golgiho aparát	Ehlersův-Danlosův syndrom
ZIP14	LIV-1	Zn, Fe, Mn, Cd	široce rozšířené, játra	PM	astma, zánět, kolorektální karcinom

Tabulka č. 4: Popis jednotlivých členů ZIP transportérů (PM - plazmatická membrána) (Jeong a Eide, 2013)

Zinkové transportéry jsou odpovědné za akumulaci zinku v prostatických buňkách. Nádorové prostatické buňky tuto schopnost akumulovat zinek postrádají a transportéry zinku se tím stávají jedním z možných viníků tohoto stavu. U prostatických buněk se jako nejdůležitější transportér zinku jeví ZIP1. To potvrzuje Johnson *et al.* (2010), ve své studii zjistili sníženou expresi ZIP1 u pacientů s KP oproti kontrolní skupině. Rishi *et al.* (2003) porovnávali exprese ZIP1 u bělošské a černošské populace. U černochů byla exprese ZIP1 snížena, což by mohlo vysvětlit rozdílnou incidenci KP mezi těmito dvěma etniky a také horší prognózu KP u černochů. Sníženou expresi ZIP1 u buněk karcinomu prostaty potvrdili také Costello *et al.* (2011) na myším modelu. Na nádorové a nenádorové buněčné línii tento rozdíl zjistili také Huang *et al.* (2006). Milon *et al.* (2010) ukázali na jeden z možných regulátorů exprese ZIP1 v prostatických buňkách. Prokázali, že na promotor ZIP1 se může vázat RREB-1 (Ras responsive element binding protein-1) a působit inhibičně. RREB-1 je transkripční faktor obsahující zinkové prsty, který může v závislosti na konkrétním promotoru působit

aktivačně nebo inhibičně. RREB-1 je aktivován kinázovou kaskádou MAPK (Ras-Raf-MEK-ERK), která je u nádorových prostatických buněk up-regulována (Gioeli, 2005). To potvrzují i Zou *et al.* (2011), kteří zjistili v buněčných liniích karcinomu prostaty zvýšenou aktivaci této dráhy a následně zvýšenou expresi RREB-1, což má za následek snížení exprese ZIP-1. Milon *et al.* (2010) zároveň při zkoumání promotoru tohoto genu zjistili další elementy, na které se mohou vázat i jiné faktory negativně ovlivňující expresi ZIP1. Naopak expresi ZIP1 mohou aktivovat hormony prolaktin a testosteron. Costello *et al.* (1999) naměřili zvýšení příjmu zinku po inkubaci nádorových buněčných linií s těmito hormony.

ZIP7 se od ostatních ZIP transportérů odlišuje svou lokalizací - je situován na membráně endoplazmatického retikula nebo Golgiho aparátu, ze kterých umožňuje transport zinečnatých iontů do cytoplazmy. Podílí se tím rovněž na udržování homeostaze zinečnatých iontů. Podle výzkumů Taylor *et al.* (2008) přispívá exprese ZIP7 k růstu a invazi buněk nádorových linií karcinomu prsu. Předpokládají, že ZIP7 je odpovědný za zvýšení intracelulární hladiny zinečnatých iontů jejich transportem z organel, což vede k inhibici fosfatáz a tím k aktivaci faktorů přispívajících k větší agresivitě nádorových buněk (EGFR, IGF-1R, Src). Toto zvýšení hladiny zinečnatých iontů může být podle Hogstrand *et al.* (2009) spuštěno kinázovou kaskádou MAPK. U ZIP7 objevili ve smyčkách na cytosolické straně potencionální místa fosforylace MAPK kinázami. Zároveň objevili také tři dokovací místa pro MAPK kinázy rovněž na cytosolické straně, což společně naznačuje možnou regulaci ZIP7 kaskádou MAPK kináz.

4 Materiál a metody

4.1 Vzorky

Do studie bylo zařazeno celkem 92 pacientů ve věku 44-80 let (průměr 65 let). Pro vyhodnocování výsledků byla k dispozici tato klinická data - věk, hodnota naměřeného PSA a u pacientů s potvrzeným karcinomem prostaty byl stanoven grading malignity (Gleason skóre) a nádorový staging (TNM). Soubor pacientů s příslušnými klinickými daty je uveden v tabulce č.5.

Vzorky byly odebírány na Urologické klinice 2. LF UK a FN Motol. Materiál byl získán buď při transrektální biopsii prostaty nebo byl odebrán z preparátu po radikální prostatektomii. Přítomnost karcinomu byla posouzena histologickým vyšetřením, při kterém byly zároveň v případě potvrzení karcinomu stanoveny výše zmiňované hodnoty Gleason skóre a TNM.

Při transrektální biopsii prostaty byla použita transrektální ultrazvuková sonda, která umožňuje cílenou kontrolu nad odebíranými vzorky. Z důvodů nespecifické struktury karcinomu bylo odebíráno více vzorků (podle naléhavosti suspekce 6-12 vzorků). Získané vzorky byly rozděleny do tří částí, část vzorků byla pro potvrzení přítomnosti karcinomu vyšetřena na Ústavu patologie a molekulární medicíny 2.LF UK a FN Motol. Zbylé vzorky byly okamžitě přeneseny do roztoku RNAlater a uchovány při teplotě - 20 °C až do extrakce mRNA.

Radikální prostatektomie je jednou z možností léčby lokalizovaného karcinomu prostaty, při tomto operačním zákroku dochází ke kompletnímu odstranění prostaty včetně semenných váčků. Takto získané vzorky byly opět podrobeny histologickému vyšetření a část z nich byla pro další studium přenesena do RNAlateru.

Kvůli nedostupnosti bioptických vzorků prostaty pacientů, u kterých není podezření na žádné patologické změny prostaty, byly jako kontrolní vzorky v této studii použity vzorky pacientů s benigní hyperplázií prostaty. Ty byly získány transuretrální resekci prostaty nebo transvezikální prostatektomií a do této kontrolní skupiny zařazeny po histologickém vyšetření, které neprokázalo nález náhodného karcinomu.

Tabulka č.5: Soubor pacientů s klinickými údaji

kód vzorku	věk	Gleason skóre	TNM klasifikace	hladina PSA (ng/ml)	diagnóza
P1	63			8,17	BPH
P2	65			2,65	BPH
P3	45	3+3	2a	2,70	KP
P5	75	3+4	3a	14,30	KP
P6	53	3+3	2c	8,22	KP
P8	63			49,90	BPH
P10	54	3+3	2a	7,20	KP
P11	74	3+3	3a	4,54	KP
P12	58	4+3	2c	6,30	KP
P13	71	5+4	2b	32,00	KP
P15	60	3+4	3b	34,00	KP
P16	61	3+3	2c	8,49	KP
P17	71				BPH
P18	62	3+3	2c	7,29	KP
P19	64	4+3	3a	11,00	KP
P20	64	4+3	3a	11,00	KP
P22	58	4+5	3b	13,15	KP
P23	69	3+3	2a	4,64	KP
P24	69	3+3	2a	4,64	KP
P25	71	3+4	2b	18,60	KP
P26	71	3+4	2b	18,60	KP
P27	70	3+4	2a	1,82	KP
P28	70	3+4	2a	1,82	KP
P29	76	3+3	2a	6,30	KP
P30	48	3+4	3a	5,50	KP
P31	54	3+3	2c	4,17	KP
P32	71	5+4	3a	4,95	KP
P33	74			6,05	BPH
P34	80	3+3	2a	2,85	KP
P35	80	3+4	3b	1,00	KP
P36	80	3+3	2a	2,85	KP
P37	74			6,05	BPH
P38	69			5,00	BPH
P39	69			5,00	BPH
P40	62			12,35	BPH
P41	62			12,35	BPH
P42	80	3+4	3b	1,00	KP
P43	71	5+4	3a	8,38	KP
P44	63	3+3	3a	6,97	KP
P45	61			2,39	BPH
P46	61			2,39	BPH
P47	60			3,38	BPH
P48	62			4,14	BPH
P49	52			3,80	BPH
P50	52			2,90	BPH
P51	60			3,38	BPH

(pokračování na další stránce)

kód vzorku	věk	GS	TNM	hladina PSA	diagnóza
P52	63	3+3	3a	19,00	KP
P53	59	3+3	3a	5,88	KP
P54	62			4,14	BPH
P55	63	3+3	2c	23,40	KP
P56	44	3+3	3a	5,60	KP
P57	62	3+3	2c	3,84	KP
P58	68	3+4	3a	9,56	KP
P59	72	3+3	2a	2,68	KP
P60	76	3+4	2c	23,78	KP
P61	59	3+4	2c	2,40	KP
P62	57	3+4	2c	5,70	KP
P63	61	4+4	3b	4,12	KP
P64	63	4+3	3a	30,74	KP
P65	72	3+3	1b	11,40	KP
P66	72	3+3	1b	11,40	KP
P67	65	3+3	2a	4,71	KP
P68	59	3+3	2a	6,78	KP
P69	58	4+3	2c	5,36	KP
P70	56	3+3	2c	6,06	KP
P72	64	3+3	2c	6,90	KP
P73	68			7,85	BPH
P74	68			7,85	BPH
P75	77	4+4	3b	2,94	KP
P76	77	4+4	3b	2,94	KP
P77	59	5+4	3b	0,99	KP
P78	59	5+4	3b	0,99	KP
P79	62	3+3	2c	5,31	KP
P80	62	3+3	2c	5,31	KP
P81	62	3+3	3a	13,30	KP
P82	56	3+4	3a	2,47	KP
P83	64	3+3	2c	6,50	KP
P84	72	3+5	3a	29,00	KP
P85	55	3+3	3a	9,52	KP
P86	64	3+4	2c	38,20	KP
P87	61	3+4	3a	13,57	KP
P88	62			4,61	BPH
P89	62			4,61	BPH
P90	70			3,60	BPH
P91	70			3,60	BPH
P92	75			3,38	BPH
P93	54	3+3	3a	18,21	KP
P94	56	4+3	3b	9,15	KP
P95	71	3+3	2b	1,21	KP
P96	71	3+3	2b	1,21	KP
P97	76			3,86	BPH
P98	76			3,86	BPH

4.2 Izolace mRNA

Z bioptických vzorků prostaty byla vyizolována mRNA. K samotné izolaci byla použita komerční souprava *Oligotex Direct mRNA Midi/Maxi Kit* od firmy Qiagen.

Postup izolace mRNA:

- 1) K odebrané tkáni (50-100 mg) bylo přidáno 0,6 ml směsi lyzačního pufru OL1 ze soupravy s přídavkem β -merkapt ethanolu (poměr 1 ml OL1 : 30 μ l β -ME). Tkáň byla zhomogenizována za pomoci rotorstatorového homogenizátoru.
- 2) Zhomogenizovaná směs byla přepipetovaná do 2 ml centrifugačních zkumavek a následně k ní bylo přidáno 1,2 ml pufru ODB. Směs byla centrifugována po dobu 4 minut při 13000 rpm (centrifuga MSE Micro Centaur MSB010.CX 2.5, poloměr rotoru 13 cm).
- 3) Supernatant byl přenesen do nové centrifugační zkumavky a bylo k němu přidáno 110 μ l suspenze Oligotexu (předem zahřáté na 37 °C). Směs byla promíchána a ponechána 10 min při pokojové teplotě. V tomto kroku došlo k navázání polyA konců mRNA na oligodT řetězců Oligotexu.
- 4) Směs byla centrifugována po dobu 6 minut při 13000 rpm. Poté byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 100 μ l směsi OL1 a β -ME (ve shodném poměru složek jako v prvním kroku izolace) a následně 400 μ l pufru ODB. Směs byla po dobu 3 minut zahřívána na 70 °C a poté ponechána 10 minut při pokojové teplotě.
- 5) Následovala centrifugace po dobu 6 minut při 13000 rpm. Supernatant byl odstraněn, k peletu bylo přidáno 350 μ l pufru OW1 a směs byla rozmíchána na vortexu.
- 6) Směs byla následně přepipetována na kolonky s Oligotexem, které jsou umístěny v centrifugačních zkumavkách a jsou součástí soupravy. Po minutové centrifugaci při 13000 rpm byl odstraněn filtrát ze zkumavky a přidáno 350 μ l pufru OW2.
- 7) Opět proběhla minutová centrifugace při 13000 rpm, filtrát byl odstraněn a tento krok s přidáním OW2 a centrifugací byl ještě jednou zopakován.
- 8) Kolonka byla přendána do nových centrifugačních zkumavek a bylo na ní naneseno 60 μ l pufru OEB (předem zahřátý na 70 °C). Zkumavka byla centrifugovaná jednu minutu při 13000 rpm. Poté bylo pro zajištění vyššího

výtěžku opětovně přidáno 60 µl pufru OEB a znovu stejně zcentrifugováno.

V tomto kroku došlo k vymytí mRNA z Oligotexu.

- 9) Ze supernatantu bylo odebráno 50 µl jako alikvot, izolovaná mRNA byla zamražena při -70 °C.

4.3 RT-PCR

Reverzní transkriptázová PCR (RT-PCR) je modifikací klasické PCR a používá se při amplifikaci RNA. RNA musí být nejprve pomocí reverzní transkriptázy přepsána do cDNA. Poté je zahájena klasická PCR, kdy se pomocí specifické dvojice primerů amplifikuje požadovaný úsek DNA. Pro RT-PCR byl použit *OneStep RT-PCR Kit* od firmy Qiagen (složení viz tabulka č.6).

Komponenty kitu
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (reverzní transkriptáza + HotStarTaq DNA Polymeráza)
QIAGEN OneStep RT-PCR Pufr, 5x
mix dNTP
voda RNase-free

Tabulka č.6: Složení kitu pro RT-PCR

Z uvedených komponentů byl namíchán mastermix pro jednotlivé analyzované geny. Na pipetování byly používány pipety KPP Autoclavable (objem 0,5-10 µl a 10-100 µl) od firmy KPP. Objem reakční směsi pro každý vzorek byl 10 µl, tj. 1 µl templátové mRNA a 9 µl mastermixu. Mastermix byl při každém pokusu připravován pro 15 vzorků (tj. 14 vzorků pacientů a 1 kontrola - blank) v objemu 135 µl. Poměr jednotlivých složek směsi byl u všech genů shodný (viz tabulka č.7). Sekvence specifických primerů byly získány z literárních zdrojů a jsou uvedeny v tabulce č.8. Koncentrace použitých primerů byla 1 µM.

Složení mastermixu pro 15 vzorků	
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	6 µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Pufr, 5x	30 µl
mix dNTP	6 µl
voda RNase-free	90 µl
Primer 1	1,5 µl
Primer 2	1,5 µl

Tabulka č.7: Složení mastermixu pro RT-PCR - pro 15 vzorků v objemu 135 µl

Gen	5' - 3' sekvence primerů	Zdroj
MT1-F	AGT CTC TCC TCG GCT TGC	(Tekur a Ho, 2002)
	ACA TCT GGG AGA AAG GTT GTC	
MT2	CAA CCT GTC CCG ACT CTA GCC	(Tekur a Ho, 2002)
	GGT CAC GGT CAG GGT TGT AC	
ZIP1	TAC AAG GAG CAG TCA GGG CCG TCA	(Gaither a Eide, 2001)
	CTA GAT TTG GAT GAA GAG CTG GGC AGT	
ZIP7	ATC GCT CTC TAC TTC AGA TC	(Taylor <i>et al.</i> , 2008)
	CTC TTC TGA ACC CCT CTT G	
GAPDH	TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA	(Babjuk <i>et al.</i> , 2003)
	CGA GAT CCC TCC AAA ATC AA	

Tabulka č.8: Sekvence a literární zdroje použitých primerů

Na provedení RT-PCR byl použit termocykler TGradient od firmy Biometra. Jednotlivé kroky RT-PCR s příslušnou teplotou a délkou trvání jsou uvedeny v tabulce č.9. U všech analyzovaných genů proběhlo shodně 30 cyklů amplifikace, odlišná byla délka některých kroků a zejména annealingová teplota. Ta byla pro každý gen určena pomocí gradientové RT-PCR, na jejímž základě byla vybrána optimální teplota pro daný gen (viz tabulka č.10).

Krok	Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
I	reverzní transkripce	50 °C	30 min
II	aktivace HotStarTaq DNA Polymerázy	95 °C	15 min
III	denaturace	90 °C	1 min (ZIP1, ZIP7) 30 s (MT1, MT2, GAD)
IV	annealing	dle genu	1 min (ZIP1, ZIP7) 30 s (MT1, MT2, GAD)
V	elongace	72 °C	1 min (ZIP1, ZIP7) 30 s (MT1, MT2, GAD)
VI	konečná elongace	72 °C	10 min

Tabulka č.9: Jednotlivé kroky RT-PCR

Analyzovaný gen	Annealingová teplota
MT1-F	65 °C
MT2	68 °C
ZIP1	65,5 °C
ZIP7	62 °C
GAPDH	61 °C

Tabulka č.10: Annealingové teploty pro jednotlivé geny

4.4 Detekce fragmentů cDNA

K detekci DNA fragmentů byla použita gelová elektroforéza. Cílem elektroforézy je separace fragmentů DNA na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli. Záporně nabitě fragmenty DNA putují k anodě, rychlost pohybu je nepřímo úměrná velikosti fragmentů.

V této práci byl jako nosič použit 2% agarózový gel. Gel připravený z 2,4 g agarózy a 120 ml 1xTBE byl obarven 12,5 µl barviva GelRed od firmy Biotinum.

Ke každému vzorku bylo před nanesením na gel přidáno 2,5 µl nanášecího pufru 5 x TD. U jednotlivých genů se lišil objem nanášeného vzorku - u genů MT1-F, MT2 a GAPDH bylo nanášeno 3 µl, u genů ZIP1 a ZIP7 bylo nanášeno 8 µl.

Fragmenty byly vizualizovány pomocí zobrazovacího přístroje MiniBIS PRO firmy Bio - Imaging Systems. Optická hustota byla měřena na denzitometru Kodak Digital Science ID od firmy Kodak Rochester.

4.5 Určení relativní exprese genů

Jako referenční gen byl v této studii zvolen provozní gen GAPDH, kódující enzym glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu.

Relativní exprese jednotlivých genů u každého pacienta byla určena pomocí podílu optických hustot proužku exprese zkoumaného genu a referenčního genu v jeho vzorcích, tj:

$$\text{relativní exprese analyzovaného genu} = \frac{\text{optická hustota proužku exprese analyzovaného genu}}{\text{optická hustota proužku exprese genu GAPDH}}$$

4.6 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení byl použit program StatSoft Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., 2007, www.statsoft.com).

Mezi naměřenými hodnotami byly v rámci statistického vyhodnocení nejdříve zjišťovány tzv. odlehlé hodnoty. To jsou hodnoty, které se v rámci statistického výběru výrazně odlišují od zbytku hodnot a nejsou do dalších statistických výpočtů zahrnuty. K jejich zjištění bylo využito kvartilů a kvartilové šíře, tj. rozdíl třetího a prvního kvartilu. Za odlehlé hodnoty byly považovány ty, jejichž hodnota byla menší než hodnota prvního kvartilu zmenšená o jedenapůlnásobek kvartilové šíře, nebo ty, které byly větší než hodnota třetího kvartilu zvětšená o jedenapůlnásobek kvartilové šíře.

Normálnost dat byla ověřena pomocí špičatosti a šikmosti dat a jejich mezí a rovněž pomocí Shapiro-Wilkova testu.

K porovnání relativní míry exprese zkoumaných genů mezi pacienty s karcinomem prostaty a souborem kontrol (tj. pacienti s BPH) byl použit dvouvýběrový nepárový t-test. Byly formulovány statistické hypotézy - nulová hypotéza H_0 a alternativní hypotéza H_1 . H_0 tvrdí, že mezi porovnávanými výběry není stran zkoumaného znaku žádný statisticky významný, signifikantní rozdíl. Proti ní stojí hypotéza H_1 , podle které se pozorovaný znak mezi oběma porovnávanými výběry signifikantně liší. Hladina významnosti byla určena jako $\alpha = 0,05$. V t-testu byla vypočítána hodnota pravděpodobnosti p , která byla porovnána s hladinou významnosti α . Byla-li hodnota p větší jak hladina významnosti α , nebyla nulová hypotéza H_0 vyvrácena. Pokud byla hodnota p menší jak hladina významnosti α , byla nulová hypotéza zamítnuta ve prospěch alternativní hypotézy H_1 .

Pro posouzení případné odlišnosti exprese zkoumaných genů mezi pacienty s karcinomem prostaty v jednotlivých klinických stádiích byla využita jednofaktorová analýza rozptylu - ANOVA (analysis of variance). Předpokladem jejího použití je mít soubory, které nevykazují statisticky významně odlišný rozptyl, to bylo ověřováno Leveneovým testem. V případě zamítnutí nulové hypotézy na hladině $\alpha = 0,05$, byla dále použita metoda mnohonásobného porovnání - LSD test ("Least Square Difference"), která umožnila porovnat jednotlivá klinická stadia a určit, mezi kterými z nich je signifikantní rozdíl. U genu, kde Leveneův test vyvrátil shodnost rozptylů jednotlivých výběrů, bylo nutné analýzu ANOVA nahradit neparametrickou alternativou, tzv. Kruskal-Wallisovým testem.

Poslední statistickou analýzou byly lineární korelace. Porovnávala se jimi závislost plazmatické hodnoty PSA, resp. závislost věku na relativní expresi daného genu. Hodnota Pearsonova korelačního koeficientu (r) zde udává, nakolik je lineární závislost ("korelace") mezi dvěma porovnávanými veličinami těsná. Je-li Pearsonův korelační koeficient v absolutní hodnotě v rozmezí 0,1 - 0,3, je korelace hodnocena jako slabá. Rozmezí 0,4 - 0,6 udává korelaci střední, 0,7 - 0,8 korelaci silnou a nad 0,9 se jedná o velmi silnou korelaci. Pokud je r kladné, pak přímka, která je důsledkem existence lineární závislosti, má kladnou směrnici, tedy s rostoucími hodnotami jedné veličiny roste i druhá veličina, naopak je-li r záporné, přímka v rovině grafu „klesá“. Míra signifikace se i v tomto případě určuje podle hladiny významnosti p .

5 Výsledky

Zjištěné relativní exprese genů byly porovnávány s dostupnými klinickými údaji pacientů za účelem zjištění případných závislostí. Pro potřeby statistické analýzy byly u každého genu vyřazeny tzv. odlehlé hodnoty, proto jsou analyzované soubory menší než celkový soubor pacientů, od nichž byl získán bioptický vzorek prostaty.

5.1 Srovnání exprese genů mezi souborem kontrol a pacienty s KP

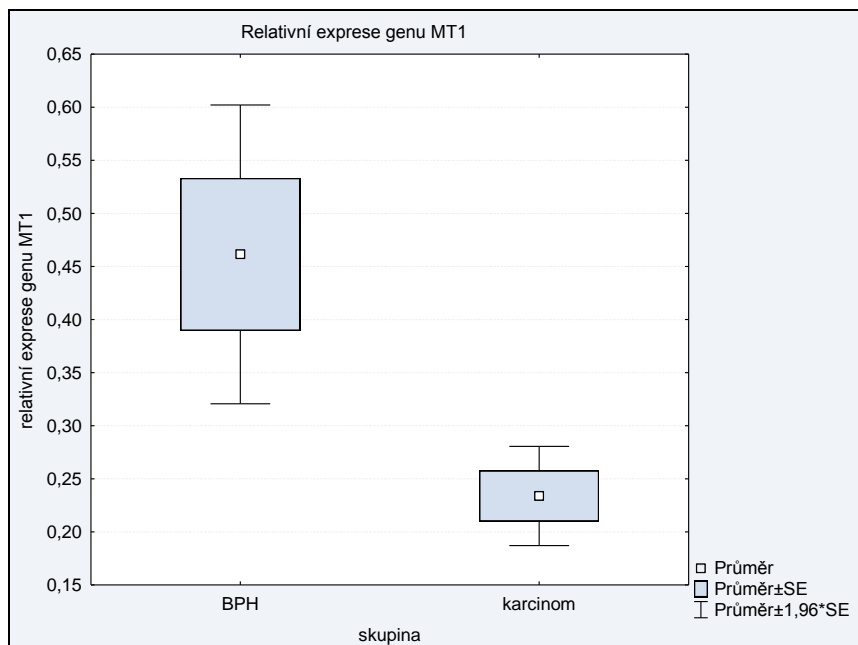
Jako soubor kontrol jsou v této práci brány vzorky pacientů s diagnostikovanou benigní hyperplázií prostaty. Pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu byly porovnány relativní exprese každého analyzovaného genu (MT1-F, MT2, ZIP1 a ZIP7) u pacientů s BPH a u pacientů s diagnostikovaným KP.

Výsledky testů jednotlivých genů jsou uvedeny v tabulkách č.11 až č.14, kde je uveden počet vzorků zahrnutých do výpočtu, průměrné hodnoty relativní exprese, směrodatná odchylka daného výběru a hladina významnosti p . Grafické znázornění poskytují grafy č.3 až č.6, na nichž malý centrální čtvereček znázorňuje hodnotu průměru, hrany velkého obdélníku značí průměr zmenšený a zvětšený o jednonásobek směrodatné chyby průměru (SE) (v tomto intervalu leží populační průměr exprese genu s pravděpodobností 68 %) a konce chybových úseček značí průměr zmenšený a zvětšený o 1,96-násobek SE (v tomto rozmezí leží populační průměr exprese genu s pravděpodobností 95 %).

Na základě vypočtených hladin významnosti p je možné vyvrátit nulovou hypotézu u genů MT1-F a ZIP1 ($p < 0,05$). **U genů MT1-F a ZIP1 byl zjištěn signifikantní rozdíl relativní exprese genu mezi souborem kontrol a pacienty s KP - u obou genů byla exprese genu nižší ve skupině pacientů s karcinomem.** U genů MT2 a ZIP7 nulová hypotéza nebyla vyvrácena, relativní exprese těchto genů nejeví mezi zkoumanými soubory statisticky významný rozdíl.

<i>MT1-F</i>	počet vzorků	průměrná hodnota exprese	směrodatná odchylka	hladina p
BPH	27	0,4614	0,3730	0,00048
KP	48	0,2338	0,1652	

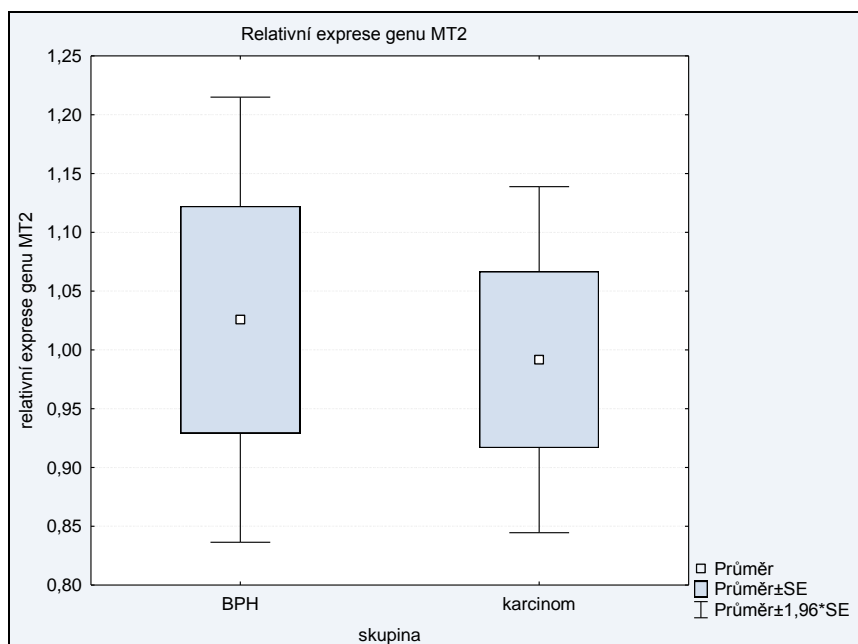
Tabulka č. 11: Porovnání relativní exprese genu MT1-F u pacientů s BPH a KP



Graf č. 3: Porovnání relativní exprese genu MT1-F u pacientů s BPH a KP

<i>MT2</i>	počet vzorků	průměrná hodnota exprese	směrodatná odchylka	hladina p
BPH	27	1,0257	0,5018	0,79651
KP	64	0,9917	0,6005	

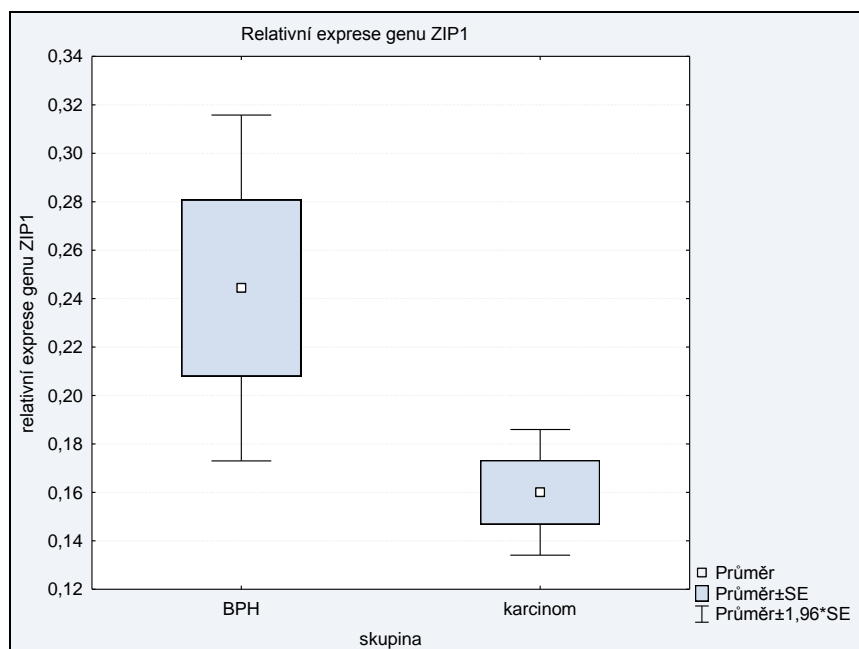
Tabulka č. 12: Porovnání relativní exprese genu MT2 u pacientů s BPH a KP



Graf č. 4: Porovnání relativní exprese genu MT2 u pacientů s BPH a KP

<i>ZIP1</i>	počet vzorků	průměrná hodnota exprese	směrodatná odchylka	hladina p
BPH	26	0,2444	0,1857	0,00818
KP	61	0,1600	0,1033	

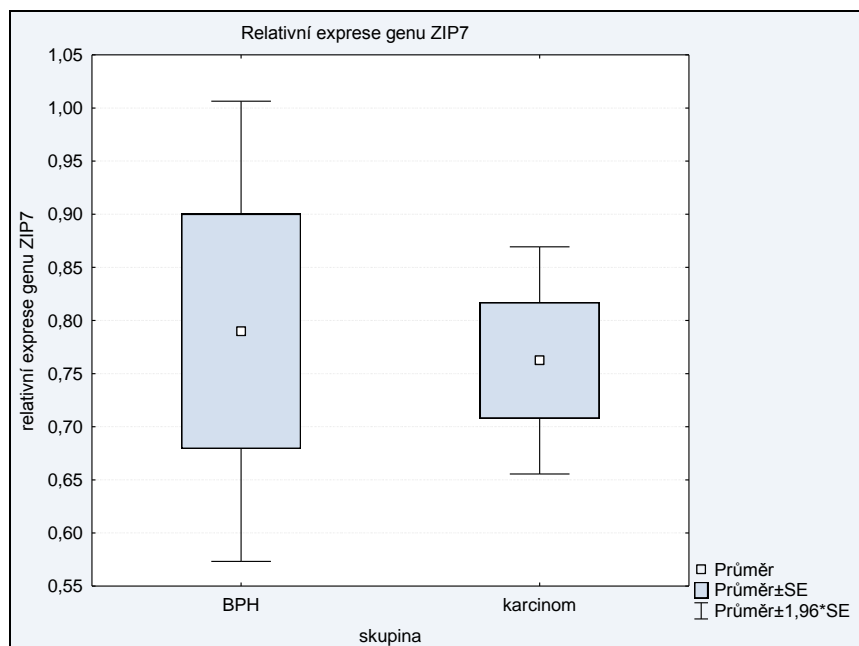
Tabulka č. 13: Porovnání relativní exprese genu ZIP1 u pacientů s BPH a KP



Graf č. 5: Porovnání relativní exprese genu ZIP1 u pacientů s BPH a KP

<i>ZIP7</i>	počet vzorků	průměrná hodnota exprese	směrodatná odchylka	hladina p
BPH	27	0,7899	0,5742	0,80440
KP	64	0,7625	0,4363	

Tabulka č. 14: Porovnání relativní exprese genu ZIP7 u pacientů s BPH a KP



Graf č. 6: Porovnání relativní exprese genu ZIP7 u pacientů s BPH a KP

5.2 Korelace exprese genů s klinickým stádiem KP

V následující analýze byla zkoumána případná korelace relativní exprese jednotlivých genů s klinickými stádii KP. Posuzovány byly nejdříve sloučené kategorie - "1+2" (1. a 2.stupeň TNM klasifikace) a "3+4", a dále jednotlivé stupně TNM klasifikace samostatně.

V analýze sloučených kategorií nebyl u žádného genu nalezen signifikantní rozdíl ($p > 0,05$). Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.15.

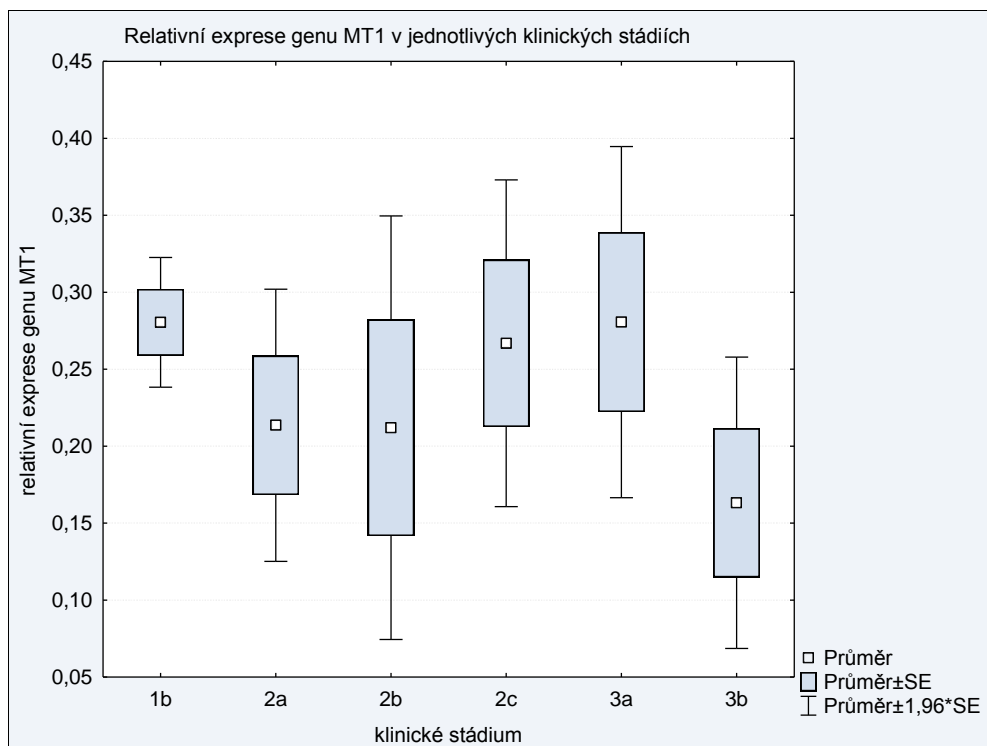
gen	skupina	počet vzorků	průměrná hodnota	směrodatná odchylka	hladina p
MT1-F	1+2	26	0,2349	0,1432	0,96238
	3+4	22	0,2326	0,1914	
MT2	1+2	35	1,0831	0,5995	0,18271
	3+4	29	0,8813	0,5930	
ZIP1	1+2	35	0,1574	0,0979	0,81962
	3+4	26	0,1636	0,1122	
ZIP7	1+2	36	0,7522	0,3677	0,83349
	3+4	28	0,7756	0,5181	

Tabulka č.15: Porovnání relativní exprese genů v rámci sloučených klinických stádií (1+2, 3+4)

V případě samostatného hodnocení jednotlivých stupňů gradingu byla **vyvrácena nulová hypotéza pro gen MT2** ($p = 0,025$). Po provedení LSD testu byl u genu **MT2 zjištěn statisticky významný rozdíl exprese mezi stádii 2a a 2c, 2c a 3a, 2c a 3b**. U ostatních genů nebyla nulová hypotéza vyvrácena ($p > 0,05$). Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č.16 až č.19, resp. v grafech č.7 až č.10.

MT1-F	počet vzorků	průměrná hodnota exprese	směrodatná odchylka	hladina p
1b	2	0,2805	0,0304	0,65678
2a	12	0,2136	0,1563	
2b	4	0,2120	0,1404	
2c	8	0,2669	0,1532	
3a	13	0,2806	0,2098	
3b	9	0,1632	0,1449	

Tabulka č. 16: Porovnání relativní exprese genu MT1-F v rámci jednotlivých klinických stádií



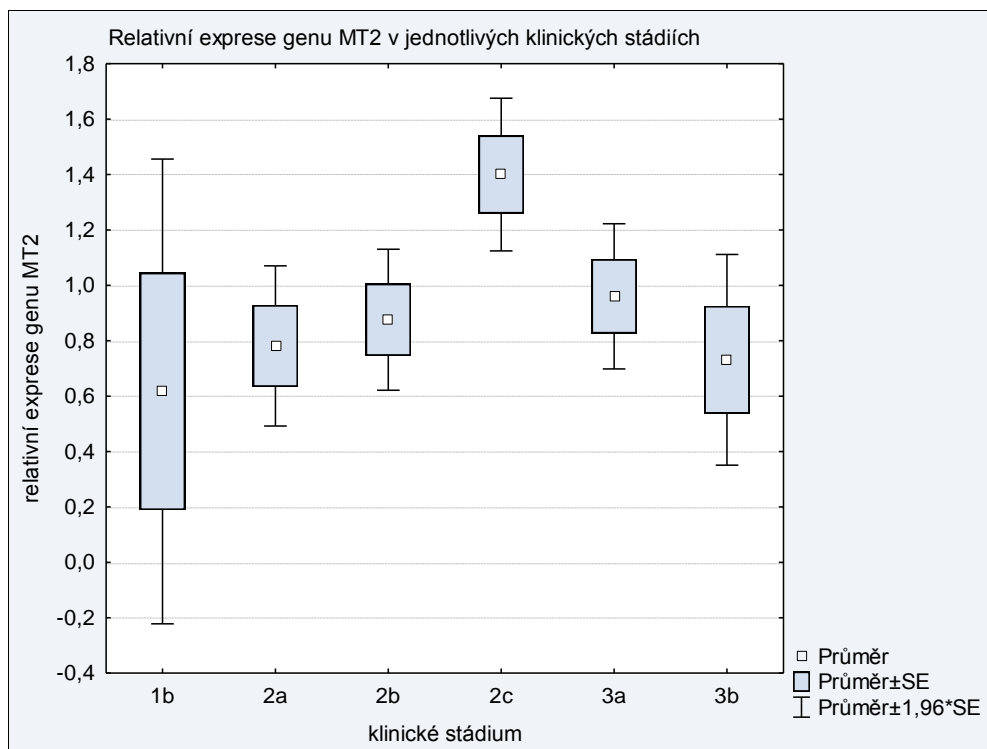
Graf č. 7: Porovnání relativní exprese genu MT1-F v rámci jednotlivých klinických stádií

<i>MT2</i>	počet vzorků	průměrná hodnota exprese	směrodatná odchylka	hladina p
1b	2	0,6170	0,6053	0,02538
2a	12	0,7811	0,5107	
2b	4	0,8757	0,2597	
2c	17	1,3999	0,5797	
3a	19	0,9603	0,5827	
3b	10	0,7311	0,6136	

Tabulka č.17: Porovnání relativní exprese genu MT2 v rámci jednotlivých klinických stádií

<i>MT2</i>	1b	2a	2b	2c	3a	3b
1b	-	0,7035	0,5970	0,0674	0,4145	0,7941
2a	0,7035	-	0,7717	0,0049	0,3908	0,8359
2b	0,5970	0,7717	-	0,0986	0,7855	0,6651
2c	0,0674	0,0049	0,0986	-	0,0226	0,0041
3a	0,4145	0,3908	0,7855	0,0226	-	0,3008
3b	0,7941	0,8359	0,6651	0,0041	0,3008	-

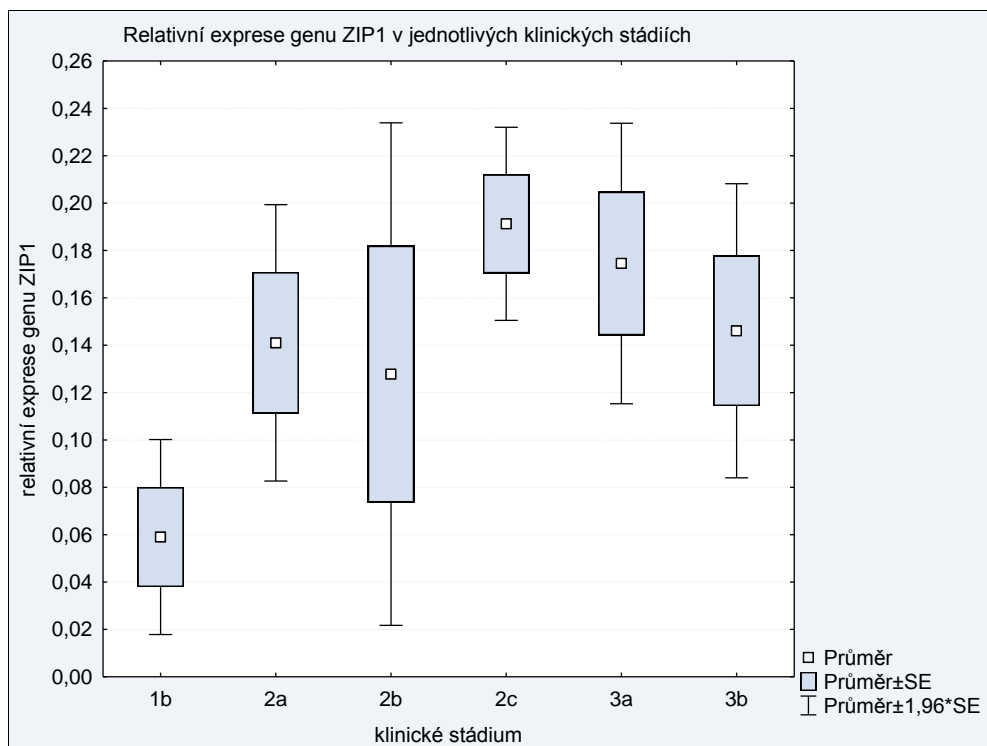
Tabulka č.18: Výsledky LSD testu pro gen MT2 - porovnání jednotlivých klinických stádií



Graf č.8: Porovnání relativní exprese genu MT2 v rámci jednotlivých klinických stádií

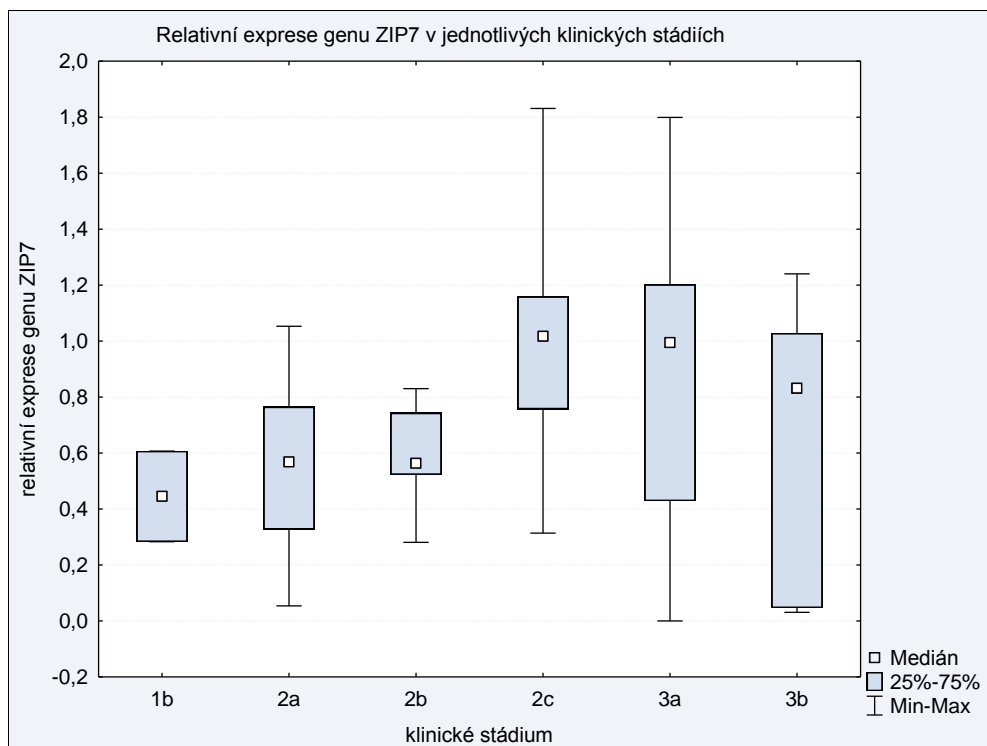
<i>ZIP1</i>	počet vzorků	průměrná hodnota exprese	směrodatná odchylka	hladina p
1b	2	0,0590	0,0297	0,45759
2a	12	0,1410	0,1031	
2b	5	0,1278	0,1210	
2c	16	0,1913	0,0832	
3a	16	0,1745	0,1209	
3b	10	0,1461	0,1002	

Tabulka č.19: Porovnání relativní exprese genu ZIP1 v rámci jednotlivých klinických stádií



Graf č.9: Porovnání relativní exprese genu ZIP1 v rámci jednotlivých klinických stádií

U genu ZIP7 Leveneův test vyvrátil shodnost rozptylu jednotlivých výběrů ($p=0,023$). Analýzu ANOVA bylo nutné nahradit neparametrickou alternativou, tzv. Kruskal-Wallisovým testem (výsledky tohoto testu zde nejsou uvedeny). Žádná signifikantní závislost mezi expresí genu ZIP7 a klinickými stádii nebyla nalezena.



Graf č.10: Porovnání relativní exprese genu ZIP7 v rámci jednotlivých klinických stádií

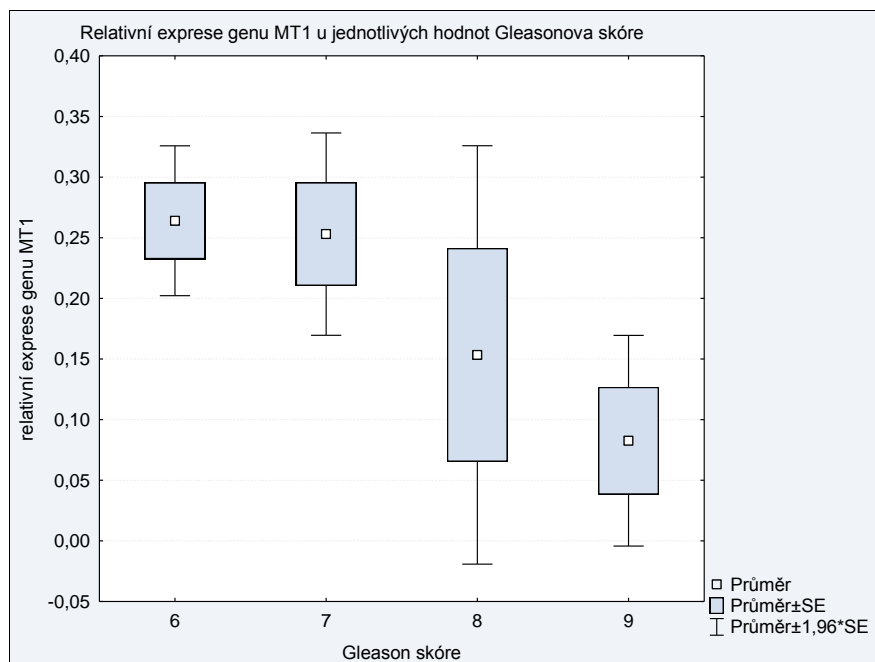
5.3 Korelace exprese genů s Gleasonovým skórem

Dalším klinickým údajem, který byl analyzován vzhledem k možné korelaci s relativní expresí genů, bylo Gleasonovo skóre. Gleasonovo skóre je součtem dvou nejvíce zastoupených stupňů gradingu vyhodnocených při histologickém vyšetření - např. pacient s výsledkem gradingu 3+4 má Gleasonovo skóre 7.

U žádného analyzovaného genu nebyla vyvrácena nulová hypotéza, tj. nebyla nalezena korelace mezi relativní expresí genu a hodnotou Gleasonova skóre. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č.20 až č.23, resp. v grafech č.11 až č.14.

<i>MT1-F</i>	počet vzorků	průměrná hodnota exprese	směrodatná odchylka	hladina p
GS 6	21	0,2640	0,1444	0,11540
7	19	0,2530	0,1856	
8	3	0,1533	0,1525	
9	5	0,0826	0,0990	

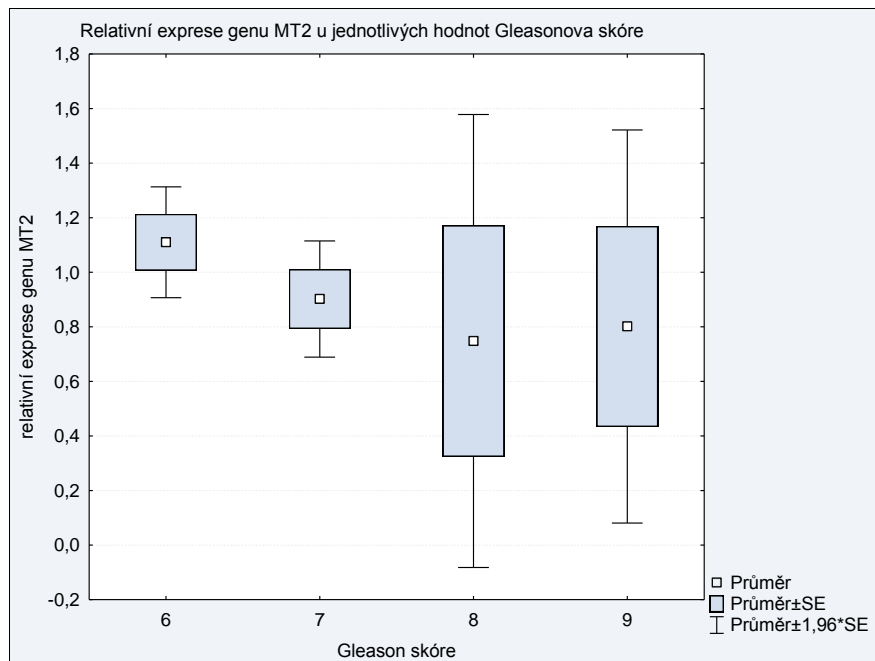
Tabulka č.20: Porovnání relativní exprese genu MT1-F s Gleasonovým skórem



Graf č.11: Porovnání relativní exprese genu MT1-F s Gleasonovým skórem

<i>MT2</i>	počet vzorků	průměrná hodnota exprese	směrodatná odchylka	hladina p
GS 6	33	1,1099	0,5953	0,40999
7	22	0,9020	0,5098	
8	4	0,7480	0,8472	
9	5	0,8012	0,8220	

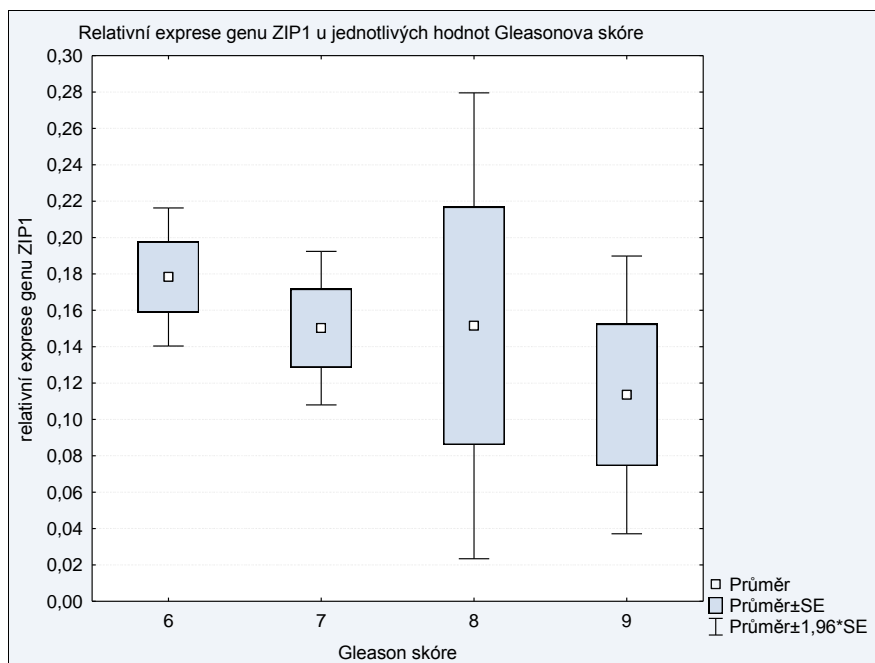
Tabulka č.21: Porovnání relativní exprese genu MT2 s Gleasonovým skórem



Graf č.12: Porovnání relativní exprese genu MT2 s Gleasonovým skórem

<i>ZIP 1</i>	počet vzorků	průměrná hodnota exprese	směrodatná odchylka	hladina p
GS 6	29	0,1783	0,1043	0,51285
7	22	0,1502	0,1010	
8	4	0,1515	0,1307	
9	6	0,1135	0,0954	

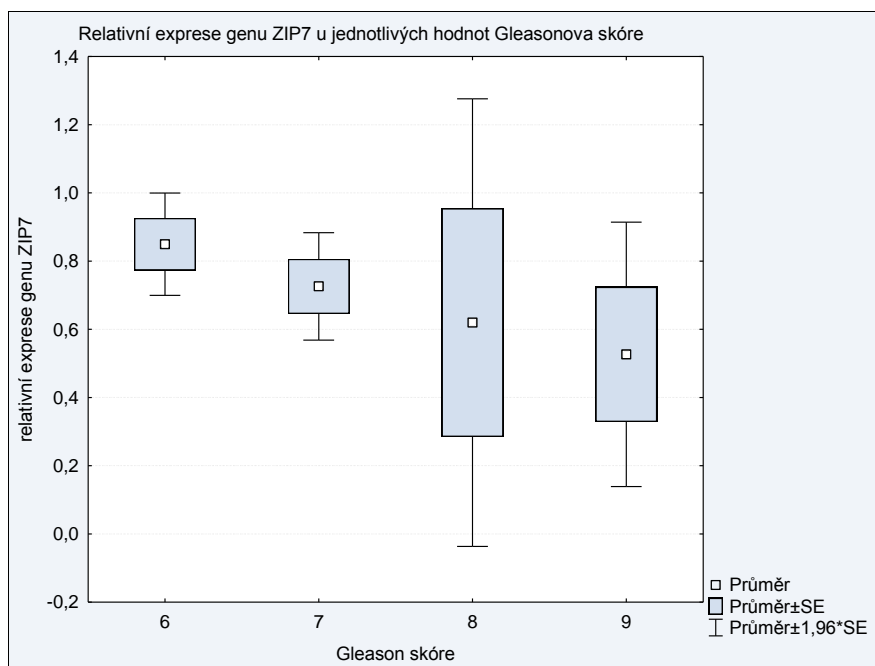
Tabulka č.22: Porovnání relativní exprese genu ZIP1 s Gleasonovým skórem



Graf č.13: Porovnání relativní exprese genu ZIP1 s Gleasonovým skórem

ZIP7		počet vzorků	průměrná hodnota exprese	směrodatná odchylka	hladina p
GS	6	32	0,8497	0,4326	
	7	22	0,7259	0,3769	
	8	4	0,6196	0,6697	
	9	6	0,5265	0,4845	
					0,31107

Tabulka č.23: Porovnání relativní exprese genu ZIP7 s Gleasonovým skórem



Graf č.14: Porovnání relativní exprese genu ZIP7 s Gleasonovým skórem

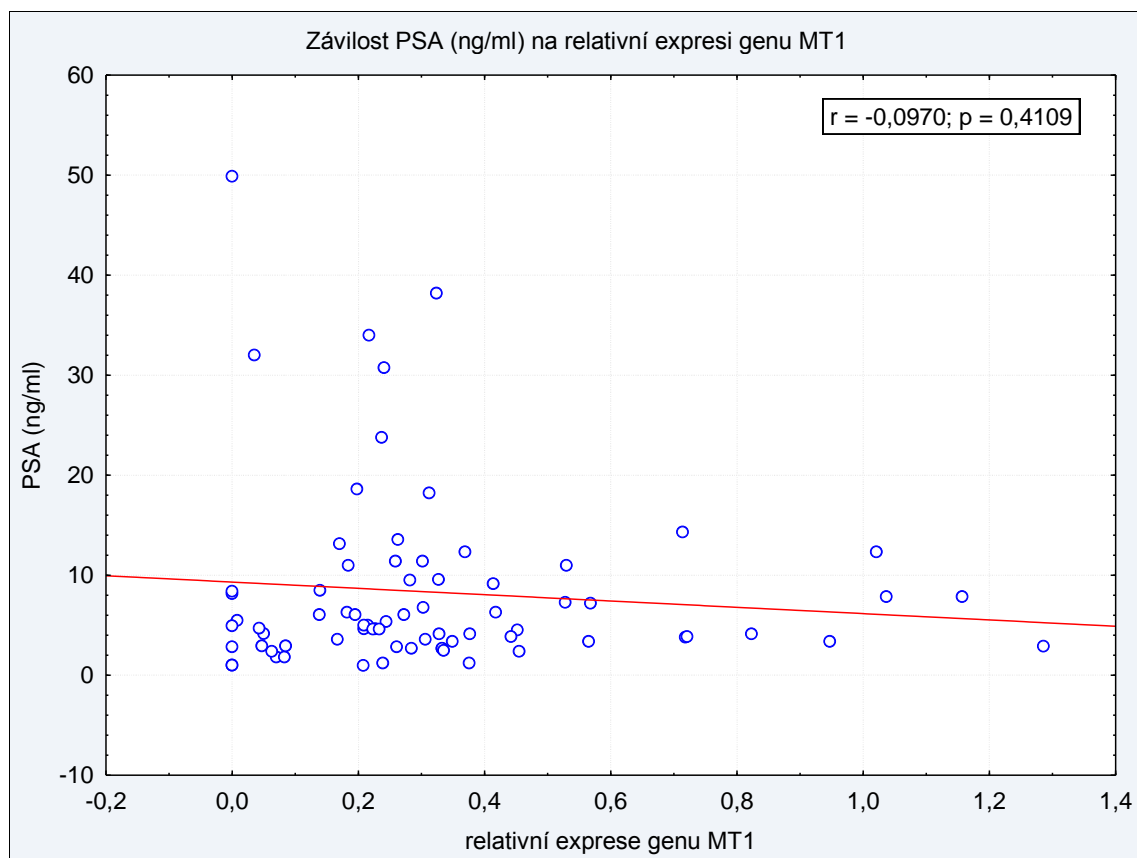
5.4 Korelace exprese genů s hladinou PSA

Jako další byla zkoumána možná lineární korelace plazmatické hladiny PSA (ng/ml) na relativní expresi daného genu. Míra signifikace je zde opět určena podle hladiny významnosti p , hodnota Pearsonova korelačního koeficientu (r) udává, jak je lineární závislost mezi dvěma porovnávanými veličinami těsná.

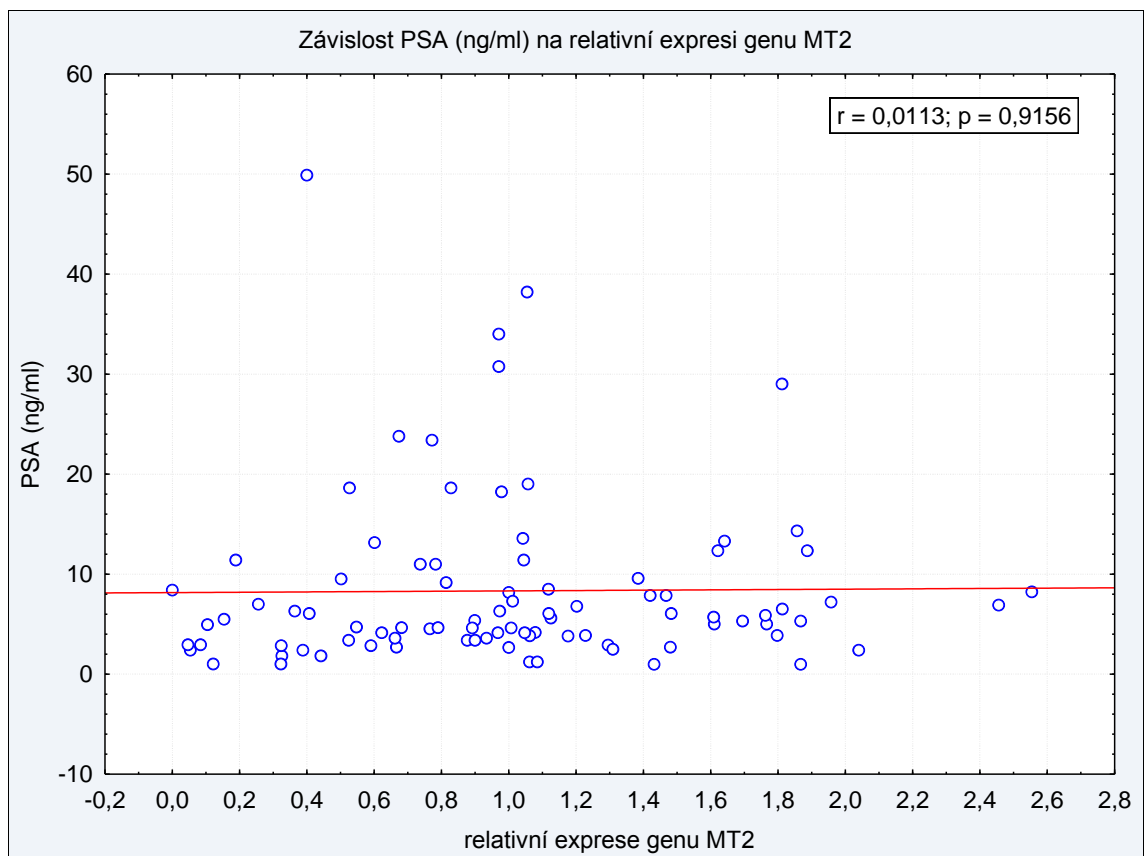
Dle hladiny významnosti p byla vyvrácena nulová hypotéza u genu ZIP7 ($p=0,0099$), tím byla **prokázána závislost hladiny PSA na expresi genu ZIP7**. Pearsonův korelační koeficient je nižší než 0,4 - jedná se o slabou závislost. Hodnota r je v tomto případě kladná, tj. se zvyšující se expresí genu ZIP7 stoupá plazmatická hodnota PSA. U zbylých tří genů je hladina významnosti p vždy vyšší než 0,05 - nulová hypotéza nebyla vyvrácena. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.24, resp. v grafech č.15 až č.18.

gen	hladina p	hodnota r
MT1-F	0,4109	-
MT2	0,9156	-
ZIP1	0,3548	-
ZIP7	0,0099	0,2706

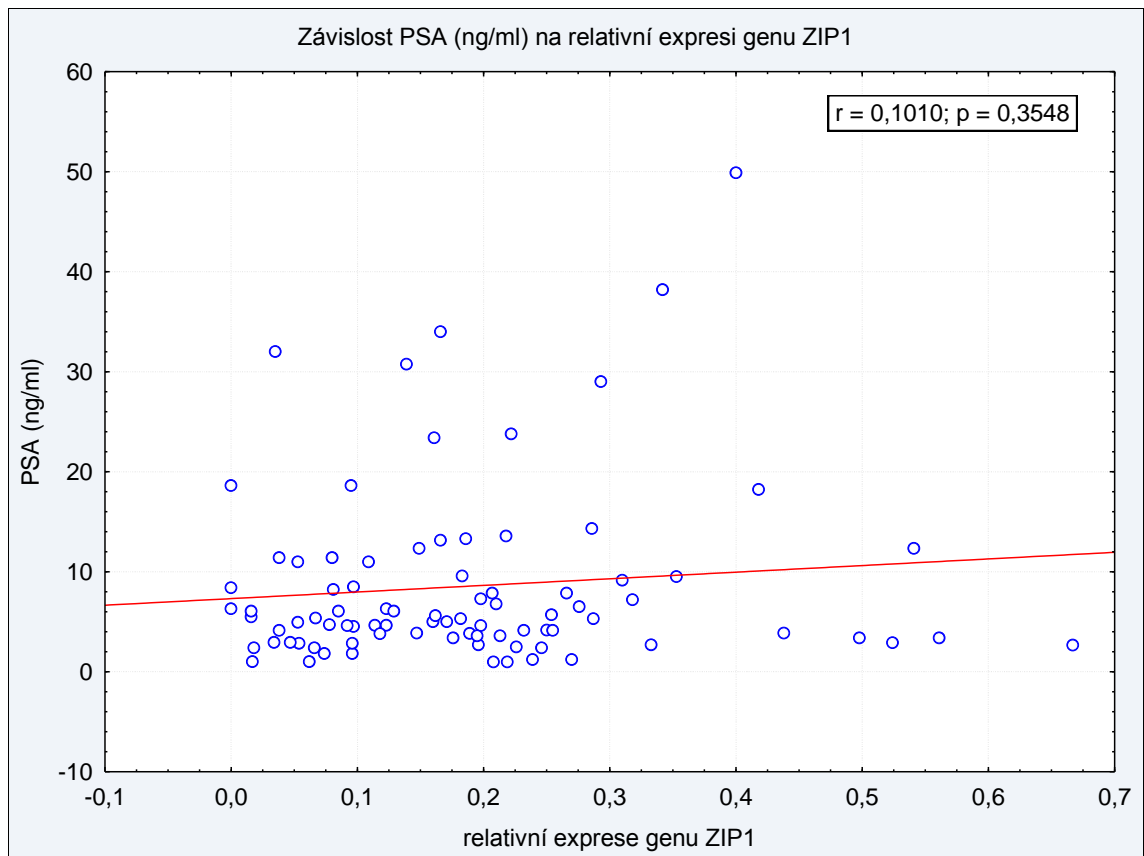
Tabulka č.24: Výsledky lineární korelace exprese genů s plazmatickou hladinou PSA



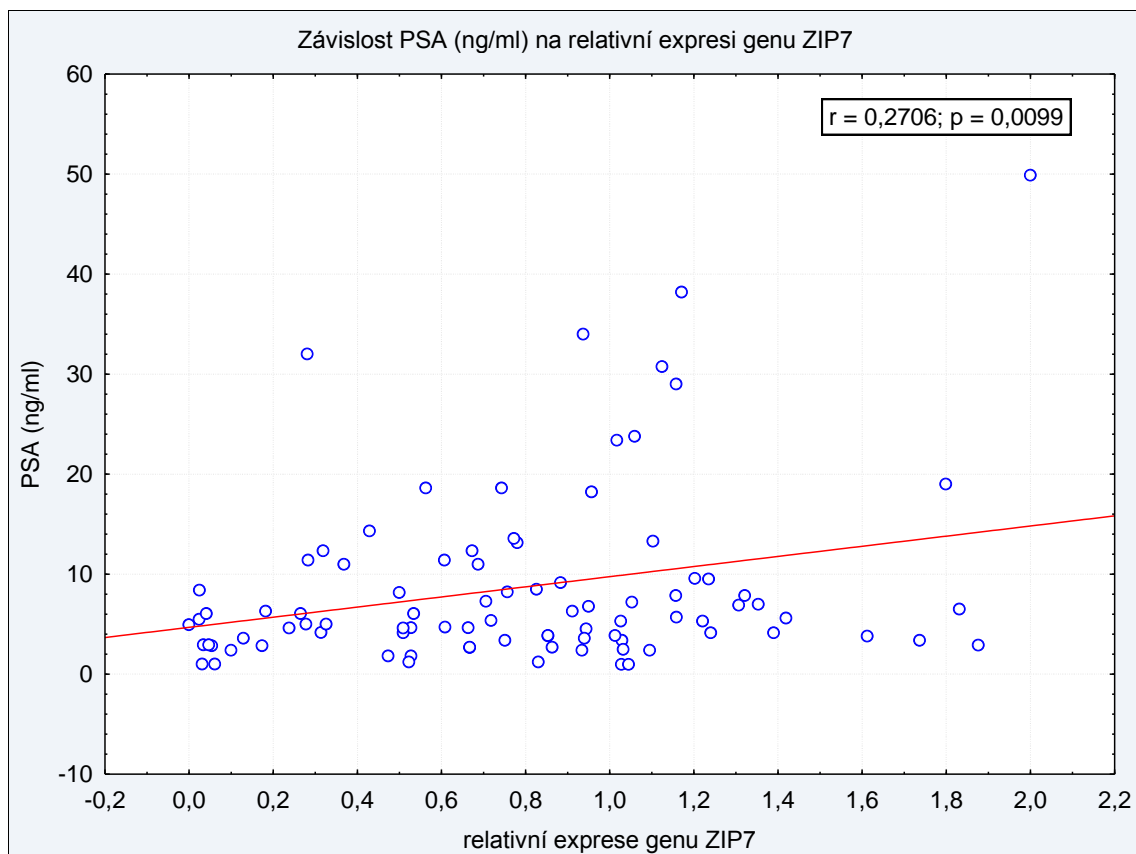
Graf č.15: Lineární korelace exprese genu MT1-F s plazmatickou hladinou PSA



Graf č.16: Lineární korelace exprese genu MT2 s plazmatickou hladinou PSA



Graf č.17: Lineární korelace exprese genu ZIP1 s plazmatickou hladinou PSA



Graf č.18: Lineární korelace exprese genu ZIP7 s plazmatickou hladinou PSA

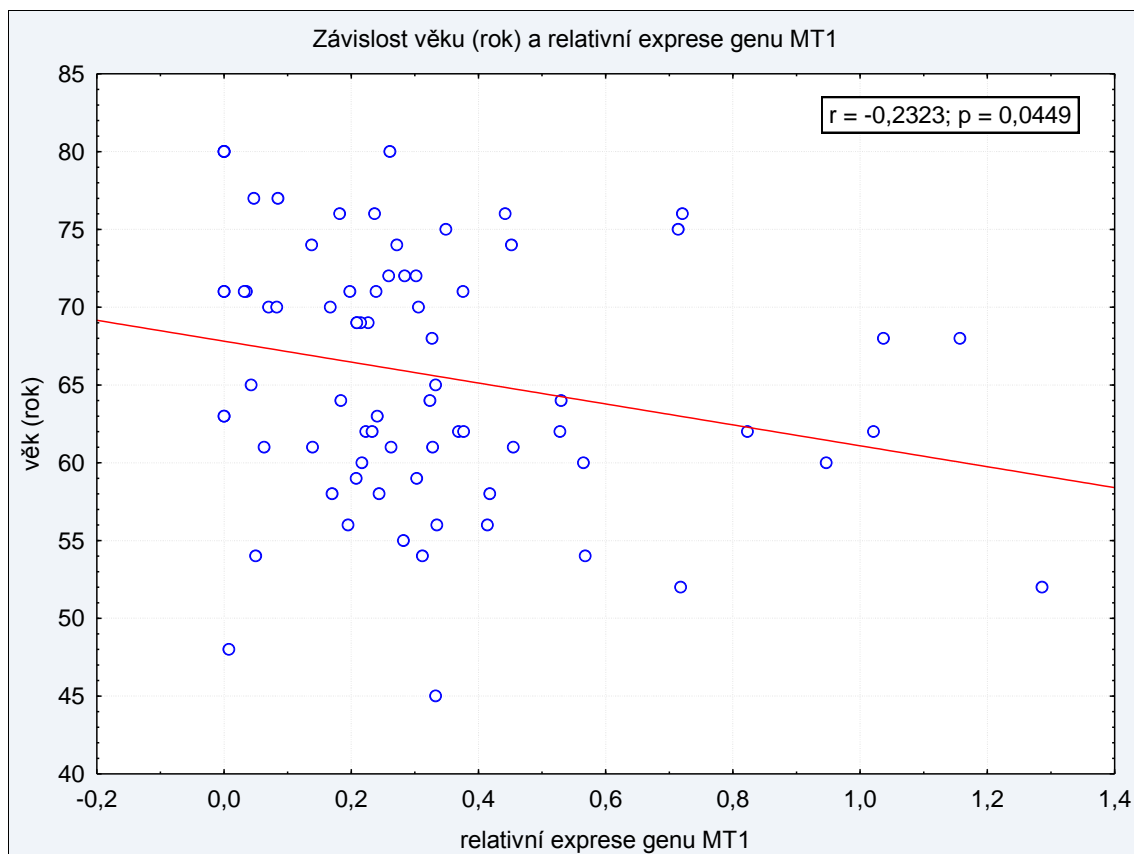
5.5 Korelace exprese genů s věkem

Stejným způsobem jako korelace s hladinou PSA byla provedena korelace exprese genů s věkem pacientů.

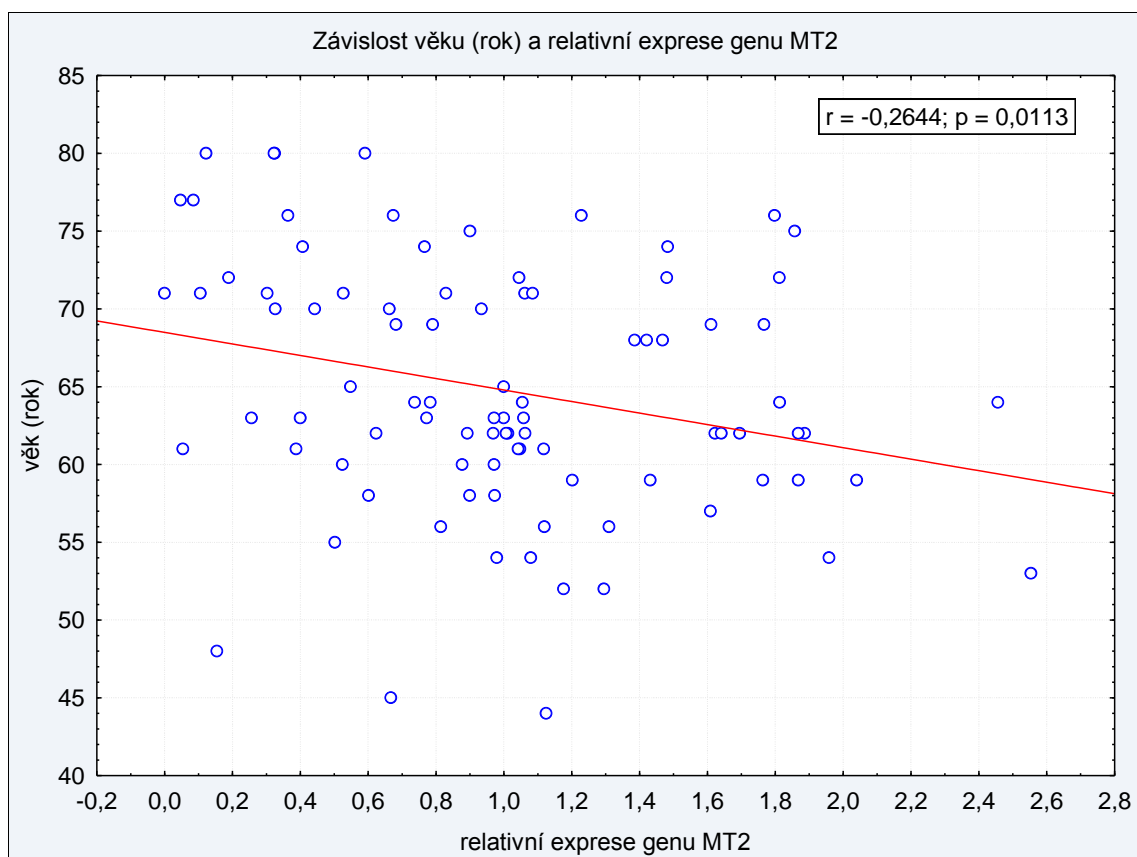
Zde se podařilo **vyvrátit nulovou hypotézu u všech čtyř genů**. Pearsonovy korelační koeficienty jsou u všech genů záporné - s rostoucím věkem klesá exprese analyzovaných genů. Hodnota r je u genů MT1, MT2 a ZIP1 nižší než 0,4 - jedná se o slabou závislost, u genu ZIP7 je hodnota vyšší než 0,4 a tuto korelaci lze hodnotit jako středně silnou závislost. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.25, resp. v grafech č.19 až č.22.

gen	hladina p	hodnota r
MT1-F	0,0449	- 0,2323
MT2	0,0113	- 0,2644
ZIP1	0,0121	- 0,2679
ZIP7	0,00001	- 0,4436

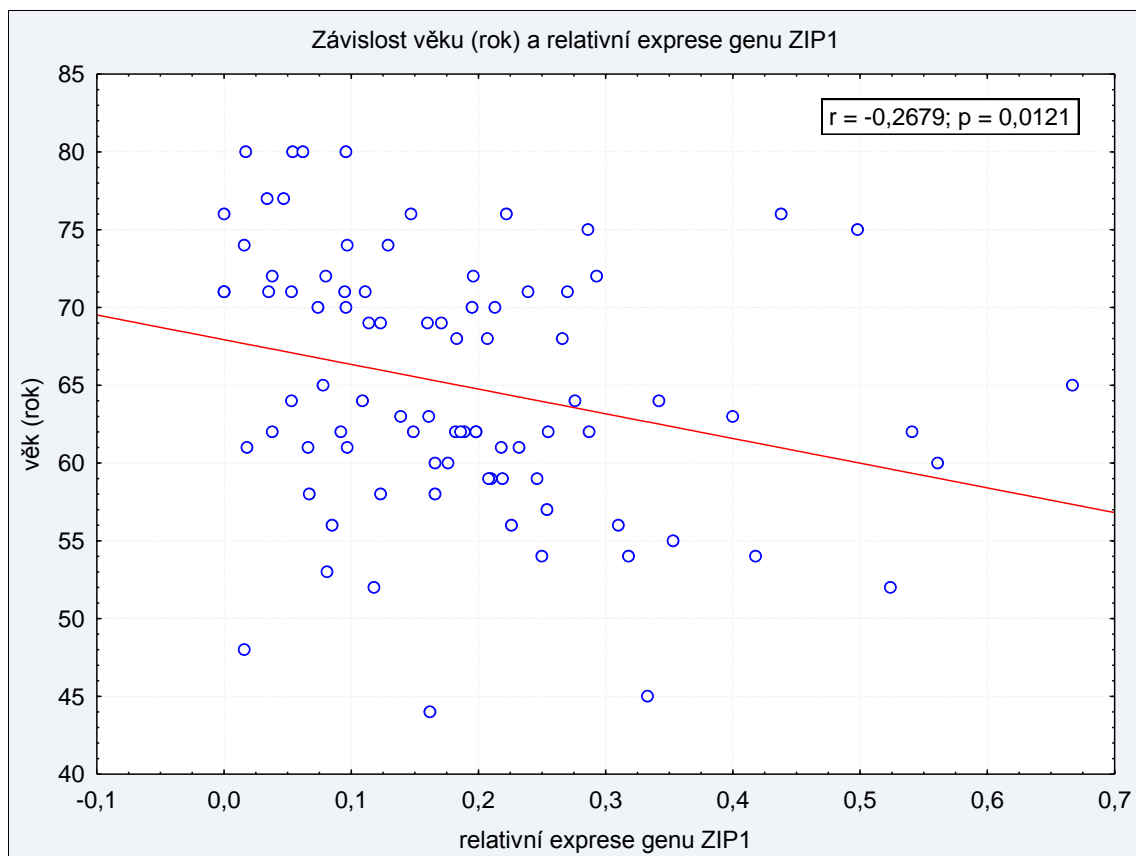
Tabulka č.25: Výsledky lineární korelace exprese genů s věkem pacientů



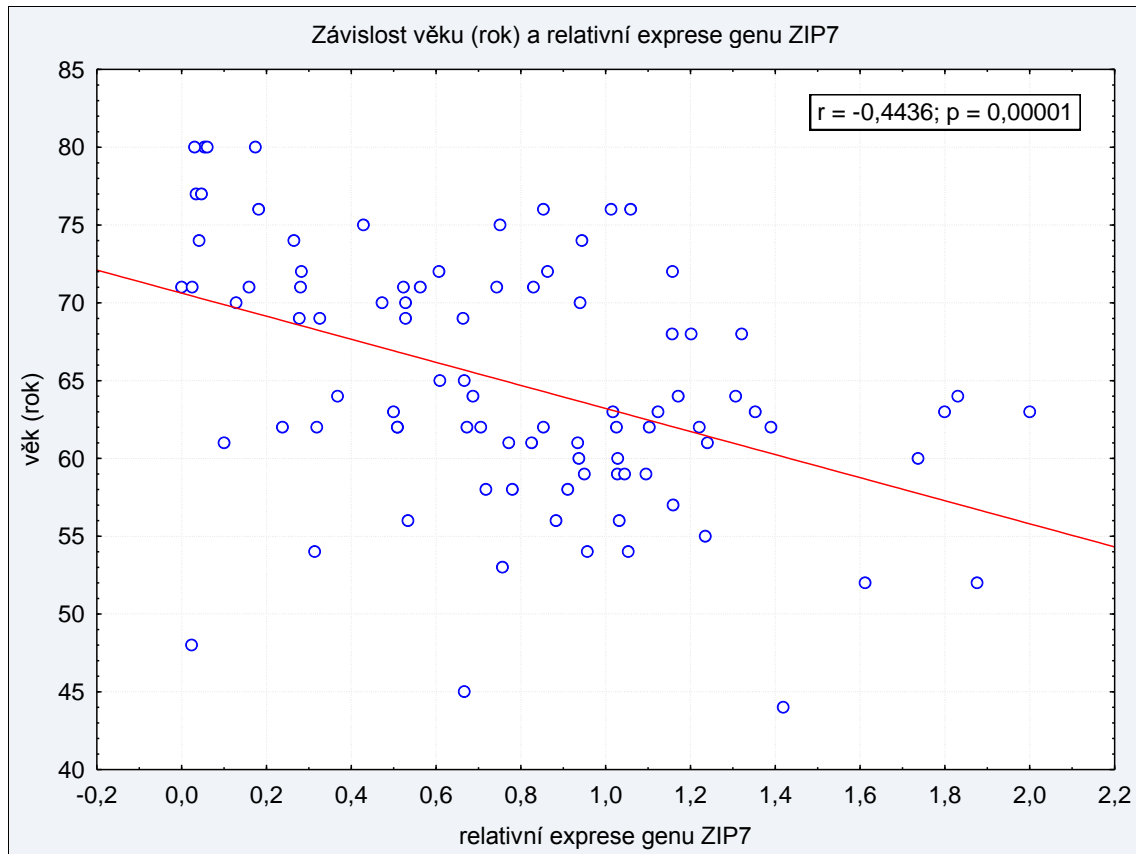
Graf č.19: Lineární korelace exprese genu MT1-F s věkem pacientů



Graf č.20: Lineární korelace exprese genu MT2 s věkem pacientů



Graf č.21: Lineární korelace exprese genu ZIP1 s věkem pacientů



Graf č.22: Lineární korelace exprese genu ZIP7 s věkem pacientů

6 Diskuze

V této práci byla použita metoda semikvantitativní RT-PCR pro zjištění exprese mRNA čtyř genů na celkovém počtu 92 vzorků. Výsledky byly porovnávány s klinickými daty jednotlivých pacientů. Konkrétní čtveřice genů byla vybrána na základě poznatků z nedávných let o jejich možné roli v patogenezi karcinomu prostaty nebo jiného nádorového onemocnění, se kterým byly dávány do souvislosti.

U těchto genů byla v předchozích studiích zkoumána úroveň jejich exprese, častěji hladina proteinů jimi kódovaných a také jejich úloha v signálních kaskádách buňky. Tyto studie byly většinou prováděny na nádorových buněčných liniích. Nejčastěji používaným typem jsou linie nesoucí označení LNCaP, PC-3 či DU-145. Jejich nevýhodou je, že jsou odvozeny z metastáz (z lymfatických uzlin, z bederní oblasti, resp. z metastáz v centrální nervové soustavě), a nikoli přímo z primárního nádoru. Mohou se tedy svým chováním mírně lišit od buněk primárního nádoru (Russell a Kingsley, 2003). Buněčné linie však mají oproti biotickým vzorkům výhodu v "koncentraci" nádorových buněk. Biotické vzorky tvoří kromě nádorových buněk z větší části také zdravé, nenádorové buňky. Což na jednu stranu poněkud snižuje možnost podchytit rozdíl mezi zdravými a nádorovými buňkami, na druhou stranu jsou případné výsledky lépe převeditelné a více odpovídající klinické praxi.

Jako kontrolní skupina byli v této práci použiti pacienti s benigní hyperplázií prostaty, neboť získat dostatečný počet biotických vzorků prostaty zdravých mužů je velmi problematické. Tkáň BPH se samozřejmě odlišuje od zdravé tkáně prostaty, v případě akumulace zinku má BPH tuto schopnost mírně zvýšenou než zdravá tkáň.

V případě porovnávání exprese genů mezi kontrolami a pacienty s KP bylo zjištěno signifikantní snížení exprese u genů MT1 a ZIP1, u genů MT2 a ZIP7 nebyla zjištěna závislost. Pro MT1 byly v práci použity primery pro izoformu MT1-F. Jak popisují ve své práci Pedersen *et al.* (2009) mohou se exprese jednotlivých izoform MT1 odlišovat svou expresí i v jednom typu nádoru, kdy například u karcinomu močového měchýře je exprese MT1-E snížena, ale exprese MT1-X naopak zvýšena. Použitím RT-PCR lze tyto jednotlivé izoformy odlišit. Naopak při zjišťování hladin proteinů imunohistochemicky použité protilátky většinou nerozliší jednotlivé izoformy MT1, ale ani rozdíl mezi MT1 a MT2, proto se nejčastěji udává zvýšení/snížení společné hladiny proteinů MT1 a MT2. U karcinomu prostaty Wei *et al.* (2008) imunohistochemicky prokázali snížení hladiny MT1 a MT2. Výsledky této práce v případě MT1-F s jejich závěry nejsou v rozporu, přesnější srovnání

nelze vzhledem k rozdílným metodám učinit. Práce, která by se zabývala expresí MT1-F na bioptických vzorcích prostaty, nebyla dosud publikována a tak dosažené výsledky této diplomové práce lze porovnat pouze s pracemi na jiných typech nádorů. V nich byla snížená hladina mRNA MT1-F ve vzorcích pacientů oproti kontrolám prokázána u hepatocelulárního karcinomu (Lu *et al.*, 2003) a u karcinomu tlustého střeva (Yan *et al.*, 2012). Naopak Jin *et al.* (2001) prokázali na vzorcích karcinomu prsu souvislost mezi zvýšenou expresí MT1-F a vyšším stupněm nádoru. Možné vysvětlení rozdílu expresí jednotlivých izoform MT1 v různých typech nádorů nabízí Pedersen *et al.* (2009), podle nichž by mohl být příčinou rozdílný původ nádorů, tj. zárodečný list, z kterého jsou tkáně odvozeny. U MT1-F na základě dosavadních prací předpokládají sníženou expresi MT1-F u karcinomů odvozených z tkání mesodermálního nebo endodermálního původu (např. hepatocelulární karcinom) a naopak zvýšenou expresi u karcinomu tkání ektodermálního původu (karcinom prsu). Výsledky předkládané práce potvrzují tuto hypotézu, neboť prostatická tkáň má mesodermální původ.

U genu MT2 nebyl zjištěn rozdíl mezi kontrolami a pacienty s KP. Ani v případě této izoformy nebyla dosud provedena žádná jiná studie na vzorcích od pacientů s KP. Expresi genu měřili Gumulec *et al.* (2012) u buněčných linií odvozených z primárního adenokarcinomu prostaty a v tomto případě se jim podařilo zjistit signifikantní zvýšení oproti nemaligní buněčné linii. Také u této izoformy MT se liší změny exprese podle typu karcinomu. Rovněž zvýšenou expresi MT2 prokázali Nguyen *et al.* (2000) u vzorků od pacientů s karcinomem ledvin. Naopak sníženou expresi MT2 oproti kontrolám zjistili Ferrario *et al.* (2008) ve vzorcích pacientů s karcinomem štítné žlázy. Výsledek u genu MT2 tedy není v přímém rozporu s některou z předchozích studií, byť nepotvrzuje výsledky u studie skupiny Gumulec *et al.* (2012). To může být dáno odlišnými vzorky, na nichž byly obě práce prováděny, tj. bioptické vzorky vs. buněčné linie. Dalším vysvětlením, byť zřejmě málo pravděpodobným, by byla možnost zvýšené exprese MT2 nejen u pacientů s KP, ale také současně i u pacientů s BPH, kteří v této práci vystupují jako kontroly. V takovéto situaci by nebyla možnost mezi nimi naměřit signifikantní rozdíl v expresi. Otázkou by však bylo, proč by měla být exprese MT2 zvýšena u KP i u BPH oproti normální zdravé tkáni.

U dalšího genu ZIP1 byl už rozdíl mezi kontrolami a KP dostatečně signifikantní, opět s nižší expresí u pacientů s KP. Toto zjištění je zcela v souladu s výsledky a závěry výzkumu Franklin *et al.* (2005). Ti imunohistochemicky zjistili sníženou hladinu proteinu ZIP1 v buňkách adenokarcinomu oproti normálním buňkám v tkáních pacientů s KP a sníženou expresi mRNA u pacientů s KP oproti kontrolám. Výsledky dosažené v diplomové práci jednoznačně potvrdily rozdílnost exprese mezi pacienty s KP a kontrolami i ve větším

souboru pacientů než v předchozí studii a také, že tento závěr je platný i pro českou mužskou populaci, neb předchozí studie probíhaly na vzorcích amerických pacientů. Výsledky dosažené v diplomové práci tedy podporují hypotézu o ZIP1 jako důležitém transportéru, který má zásadní roli v akumulaci zinku a jehož snížení exprese je jedním, pravděpodobně nezbytným krokem v progresi prostatických buněk do maligního stádia.

Poslední gen ZIP7 nevykazoval žádný signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou s KP. Expres tohoto genu nebyla dříve v souvislosti s karcinomem prostaty studována a není tím pádem možnost srovnání. Opět, stejně jako u genu MT2, lze hypoteticky předpokládat shodnou změnu exprese u pacientů s KP a s BPH. Mnohem pravděpodobnější ale je, že tento gen vliv na přechod normální prostatické buňky na buňku nádorovou nemá anebo není natolik velký, aby bylo možné tuto změnu postihnout měřením jeho exprese. Nelze však vyloučit možnost, že vliv ZIP7 v kancerogenezi není dán změnou exprese tohoto genu, ale například jeho zapojením do určitých signálních drah spojených s proliferací a diferenciací buněk (MAPK kaskáda) a s tím spojené například posttranslační modifikace, jejichž možnost ve své práci naznačuje Hogstrand *et al.* (2009).

Při hledání korelací mezi expresí genů a jednotlivými stupni TNM klasifikace byl signifikantní rozdíl zaznamenán pouze u genu MT2. Zde nad ostatní stadia vyčnívalo zvýšenou expresí stadium T2c. Podle TNM klasifikace v tomto případě primární nádor zasahuje oba laloky prostaty, ve stádiu T2b a nižší je to pouze jeden lalok, u vyšších stádií již primární nádor prostoupil pouzdrem a překročil hranici prostaty. U nádorových buněčných linií karcinomu prsu byla ukázána souvislost mezi vyšší expresí MT2 a vyšší proliferací a invazivitou nádorových buněk (Jin *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2002; Tai *et al.*, 2003). U nemalobuněčného typu karcinomu plic znamenala zvýšená exprese MT1-F a MT2 rovněž horší prognózu pro pacienty (Werynska *et al.*, 2013). Naměřená exprese MT2 v této práci by mohla být s výsledky výše uvedených studií v souladu, a to zejména pokud by zvyšování exprese pokračovalo i ve stádiích T3, pak by bylo možné usuzovat na vztah "vyšší exprese MT2 - vyšší invazivita nádorových buněk". Ovšem při snížení exprese MT2 ve stádiích T3 tato hypotéza jen těžko obstojí.

Nenalezení korelace mezi rostoucím stupněm klasifikace nádoru a expresí MT1-F a ZIP1, u kterých byl rozdíl mezi expresí kontrol a vzorků KP, je možné vysvětlit nutností snížené exprese těchto genů na počátku kancerogeneze. V případě genu ZIP1 by to odpovídalo teorii o nutnosti snížení exprese ZIP1 pro možnost přechodu do maligního stadia související se snížením hladiny zinku (Franklin *et al.*, 2005). Na základě využití obou

výsledků najednou se dá tedy usuzovat, že snížení exprese těchto dvou genů představuje jeden z nutných kroků přerodu zdravé buňky na buňku maligní a tato snížená exprese je poté trvale udržována i při následném růstu nádoru.

Expresa ZIP7 rovněž nekorelovala se stupněm nádoru, takže se zdá, že tento gen nemá velký vliv kromě vzniku nádoru a ani na jeho progresi nádoru. Stejně jako u vzniku nádoru ale nelze zcela ztracovat možnost vlivu tohoto genu na růst nádoru a to nikoli cestou snížení/zvýšení své exprese, ale účastí v signálních drahách.

Gleason skóre bylo jedinou kategorií klinických dat, kde nebyla nalezena korelace ani u jednoho genu. I zde by bylo možné použít stejné argumenty pro MT1-F a ZIP1 jako u TNM klasifikace - snížení exprese je zřejmě nutné na počátku vzniku nádoru a v dalším průběhu onemocnění se již nemění a neovlivňuje tak ani morfologii nádorové buňky posuzované u gradingu. Potvrzení korelace exprese některého genu s vyšším GS, by dávalo možnost využít tento gen pro určení prognózy dalšího vývoje nádoru a jeho agresivitu.

V případě sérové hladiny PSA byla nalezena slabá korelace s genem ZIP7 - s vyšší expresí ZIP7 se zvyšovala hladina PSA. Jelikož je ZIP7 transmembránový protein na ER, stěží by mohl přímo regulovat množství hladiny PSA v séru. Pokud by měl mít vliv na sérovou hladinu PSA, musel by existovat nějaký mezičlánek, který by spojil zvýšenou expresi ZIP7 se zvýšením exprese PSA nebo zvýšením exportu PSA do extracelulárního prostředí. Možností je opět signalizace pomocí MAPK kinázové kaskády. Dalším vysvětlením by mohla být funkce ZIP7 - udržování homeostaze Zn a možnost regulovat hladinu zinečnatých iontů pomocí jejich intracelulárních "zásobáren", a to v případě, pokud by exprese nebo sekrece PSA byla indukována zvýšením hladiny zinečnatých iontů. Což nebylo dokázáno a lze to jen stěží předpokládat, pokud je hladina PSA zvýšena u pacientů s BPH i s KP, které jsou na rozdílných koncích škály, co se týče koncentrace zinku v buňkách.

Posledním klinickým údajem byl věk pacientů. V tomto případě byla korelace prokázána ve všech čtyřech případech a vždy se jednalo o snížení exprese genu s rostoucím věkem. Vzhledem k tomu, že je jen málo studií těchto genů na bioptických vzorcích, se kterými by byl spojen tento klinický údaj, neobjevila se zatím žádná práce, která by tuto závislost potvrzovala nebo vyvracela a nelze tedy dosažené výsledky porovnat. Ale například u karcinomu prsu Jin *et al.* (2002) nezjistili žádnou signifikantní korelaci mezi MT2 a věkem. Možným vysvětlením této korelace by mohla být metylace promotorů těchto genů, která by

pozitivně korelovala s věkem a tím se s vyšším věkem snižovala exprese genů. Heyn *et al.* (2012) srovnávali úroveň metylace promotorů mezi novorozenci a stoletými jedinci. Zjistili, že genom stoletých jedinců je obecně méně metylovaný, zejména v oblastech tkáňově specifických genů a genů, v jejichž promotoru se nevyskytuje příliš CpG ostrůvků. Naopak zjistili vyšší metylaci právě v promotorech genů, které byly s těmito CpG ostrůvky asociovány. Souvislost mezi věkem a metylací přímo u genů buněk prostatické tkáně zkoumali Kwabi-Addo *et al.* (2007). Prokázali, že některé z jimi zkoumaných genů (nebyl zde však zahrnut žádný gen analyzovaný v této diplomové práci) opravdu vykazují zvýšenou metylaci v souvislosti s rostoucím věkem. Pokud by do této kategorie spadaly i geny z této práce mohlo by to vysvětlit závislost jejich exprese na věku. Zde by však bylo zajímavé porovnat expresi genů mezi prostatickou nádorovou tkání a zcela zdravou tkání a určit případné rozdíly v metylaci. Pokud by i u zdravé tkáně docházelo k postupnému zvyšování metylace a tím snižování exprese s ohledem na věk, mohla by to teoreticky být jedna z příčin rostoucí incidence KP s věkem, což by se z těchto genů týkalo především genů ZIP1 a MT1-F. Obecně metylace genů hraje roli v projevu onemocnění a rakoviny, například právě u karcinomu prostaty se předpokládá, že dalším nutným krokem k přechodu do maligního stádia je hypermethylace promotoru genu GSTP-1 (Lee *et al.*, 1994). Co se týče metalothioneinů, tak hypermethylace promotoru MT1-G je asociována s vyšším stupněm KP (Henrique *et al.*, 2005).

Klinicky nejzajímavějšími výsledky této práce jsou zjištěné snížené exprese MT1-F a ZIP1 u pacientů s diagnostikovaným karcinomem prostaty oproti kontrolám. V případě ZIP1 se tím potvrzují předpoklady hypotézy o nutnosti metabolické transformace pro vznik nádorové buňky. U MT1-F byly naměřené hodnoty rovněž natolik rozdílné, že i zde lze hovořit o snížení exprese MT1-F jako o jednom z nutných kroků při kancerogenezi. Geny ZIP1 a MT1-F by se tím pádem daly považovat za tumor supresorové geny karcinomu prostaty.

Expresi genů byla zjišťována na relativně velkém souboru vzorků od pacientů, oproti předchozím studiím na liniích nádorových prostatických buněk tím byly výsledky získány a potvrzeny na reálných vzorcích karcinomu prostaty. Zejména u MT1-F by bylo vhodné provést měření exprese i ve vzorcích zcela zdravé prostatické tkáně a porovnat je opět s výsledky u karcinomu prostaty, aby bylo vyloučeno případné zkreslení dosažených výsledků použitím vzorků benigní prostatické hyperplázie jako kontrolního souboru.

Další studium metalothioneinů a zinečnatých transportérů a jejich role v prostatických buňkách však bude nezbytné. Důležité poznatky by mohlo přinést změření exprese všech jednotlivých izoform metalothioneinů v nádorových vzorcích a jejich porovnání se zdravou tkání. Neméně důležité by bylo zjištění a porovnání těchto expresí i s buňkami prostatické intraepiteliální neoplazie - předstupněm karcinomu prostaty, zda i u nich by bylo možné vysledovat snížení exprese a pokusit se tím určit, kdy dochází k tomuto snížení exprese. Určení expresí jednotlivých izoform by mohlo vést k určení jejich rolí v rozvoji onemocnění, zda je mezi nimi možná vzájemná funkční zastupitelnost nebo zda je některá izoforma kritickou z hlediska karcinomu prostaty. Z obecnějšího hlediska by mohly tyto výsledky být přínosem i pro studium jiných typů karcinomů a porovnání vzájemných výsledků u jednotlivých typů nádorů by opět mohlo poněkud osvětlit roli metalothioneinů. U genů se sníženou expresí bude nutné popsat dráhy nebo elementy, které jsou za toto odpovědné, pochopit jejich provázanost se signalizací a prostředím prostatické tkáně a ideálně najít možnosti, jak jejich vliv inhibovat. Transportér ZIP7 může být pravděpodobně posttranslačně modifikován kinázami, opět bude nutné ozřejmit jaké signály a odkud se na něm "sbíhají", co je ovlivňuje a spouští a jak je jimi ovlivněn samotný zinečnatý transportér.

Detailnější pochopení metabolismu zinku v prostatických buňkách a faktorů, které ho ovlivňují, může přinést nové postupy v diagnostice a terapii karcinomu prostaty. Nutnost metabolické proměny nádorových buněk s ohledem na snížení koncentrace zinečnatých iontů by se mohla stát terčem nových preventivních, diagnostických a terapeutických postupů. Je-li, tak jak tvrdí hypotézy, při přechodu buněk do maligního stádia nutné ukončení inhibice mitochondriální akonitázy a s tím spojené nastartování klasického Krebsova cyklu, lze do budoucna uvažovat o vytvoření specifického inhibitoru mitochondriální akonitázy v prostatických buňkách a tím buď zamezit kancerogenezi nebo omezit další růst nádoru. Stejně tak je důležité prostudovat faktory vedoucí ke snížení exprese ZIP1 a na základě toho se nějakým terapeutickým postupem pokusit zamezit jejich projevu. Jinou možností by bylo nalézt způsob, jakým udržet vysokou koncentraci zinečnatých iontů v prostatických buňkách, i přes sníženou expresi ZIP1. Hudbou budoucnosti by mohlo být i zvýšení exprese zinečnatého transportéru pomocí genetické manipulace. Roli bude zřejmě hrát i samotná dostupnost zinečnatých iontů z extracelulárního prostředí, její umělé zvýšení by opět mohlo vést k zamezení rozvoje karcinomu (Costello a Franklin, 2006).

Kromě rozvoje terapeutických možností lze změnu metabolismu nádorových buněk využít i k diagnostice karcinomu prostaty. V současnosti prakticky jediný diagnostický marker je sérová hladina PSA. Jeho hladinu však kromě karcinomu prostaty zvedá rovněž benigní hyperplázie prostaty či zánět prostaty. Diagnostika tak není zcela přesná a poskytuje řadu falešných výsledků. Costello a Franklin (2009) navrhuji zaměřit se při diagnostice na složení prostatického sekretu, kde se koncentrace citrátu u pacientů s KP výrazně odlišují od pacientů s BPH, a tím by bylo možné tato dvě onemocnění odlišit. Nový diagnostický marker, který by měl PSA doplnit nebo nahradit, by měl mít větší specifitu a být neinvazivní, což by tato metoda splňovala, ale její uvedení do klinické praxe zřejmě nějaký čas potrvá, pokud se tak vůbec někdy stane.

Výsledky této diplomové práce mohou svým malým dílem přispět k dalšímu pochopení průběhu kancerogeneze buněk prostaty. Bude však nutné tyto výsledky, zejména v případě MT1-F, potvrdit ještě dalším výzkumem.

7 Souhrn

- » bylo získáno celkem 92 vzorků - 65 vzorků od pacientů s karcinomem prostaty, 27 vzorků od pacientů s benigní prostatickou hyperplázií
- » ze všech vzorků byla vyizolována mRNA
- » pro každý gen byly optimalizovány podmínky RT-PCR, především annealingová teplota
- » byly změřeny exprese jednotlivých genů, které byly vztaženy k expresi provozního genu
- » tyto relativní exprese byly porovnány mezi souborem kontrol a souborem pacientů s karcinomem prostaty a rovněž s klinickými údaji pacientů - věk, hladina prostatického specifického antigenu, staging a grading nádoru
- » statistická analýza přinesla několik výsledků
 - » signifikantní snížení exprese genů MT1-F a ZIP1 v souboru vzorků pacientů s karcinomem prostaty oproti kontrolnímu souboru
 - » závislost exprese genu MT2 na stupni klasifikace nádoru
 - » pozitivní korelaci exprese genu ZIP7 se vzrůstající hladinou prostatického specifického antigenu
 - » u všech čtyř genů - MT1-F, MT2, ZIP1 a ZIP7 negativní korelaci jejich exprese s rostoucím věkem pacientů
- » dle dosažených výsledků lze geny MT1-F a ZIP1 považovat za tumor supresorové geny karcinomu prostaty a za jeho potencionální markery

8 Seznam použité literatury

- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. a Rosato, A. 2006. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of proteome research*. 5:196-201.
- Babjuk, M., Soukup, V., Mareš, J., Dušková, J., Sedláček, Z., Trková, M., Dvořáček, J., Hanuš, T., Novák, J. a Povýšil, C. 2003. Exprese genů PAX5 a Shb, analýza mutací genu p53 a exprese proteinu p53 ve tkáni povrchových nádorů močového měchýře. *Česká urologie*. 2:26-30.
- Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., Skutkova, H., Provaznik, I., Hubalek, J. a Kizek, R. 2012. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics : integrated biometal science*. 4:739-750.
- Bostwick, D.G., Liu, L., Brawer, M.K. a Qian, J. 2004. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Reviews in urology*. 6:171-179.
- Costello, L.C. a Franklin, R.B. 2000. The intermediary metabolism of the prostate: a key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. *Oncology*. 59:269-282.
- Costello, L.C. a Franklin, R.B. 2006. The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Molecular cancer*. 5:17.
- Costello, L.C. a Franklin, R.B. 2009. Prostatic fluid electrolyte composition for the screening of prostate cancer: a potential solution to a major problem. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 12:17-24.
- Costello, L.C., Franklin, R.B., Zou, J., Feng, P., Bok, R., Swanson, M.G. a Kurhanewicz, J. 2011. Human prostate cancer ZIP1/zinc/citrate genetic/metabolic relationship in the TRAMP prostate cancer animal model. *Cancer biology & therapy*. 12:1078-1084.
- Costello, L.C., Guan, Z., Kukoyi, B., Feng, P. a Franklin, R.B. 2004. Terminal oxidation and the effects of zinc in prostate versus liver mitochondria. *Mitochondrion*. 4:331-338.
- Costello, L.C., Liu, Y., Zou, J. a Franklin, R.B. 1999. Evidence for a zinc uptake transporter in human prostate cancer cells which is regulated by prolactin and testosterone. *The Journal of biological chemistry*. 274:17499-17504.
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C. a Rofe, A.M. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 59:627-647.
- Čihák, R. 2002. Anatomie 2, 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 470 s. ISBN 80-247-0143-X.
- Dvořáček, J. a Babjuk, M. 2005. Onkourologie. 1. vyd. Praha: Galén, 589 s. ISBN 80-726-2349-4.

- Eckschlager, T., Adam, V., Hrabeta, J., Figova, K. a Kizek, R. 2009. Metallothioneins and cancer. *Current protein & peptide science*. 10:360-375.
- Feng, P., Li, T., Guan, Z., Franklin, R.B. a Costello, L.C. 2008. The involvement of Bax in zinc-induced mitochondrial apoptosis in malignant prostate cells. *Molecular cancer*. 7:25-29.
- Ferrario, C., Lavagni, P., Gariboldi, M., Miranda, C., Losa, M., Cleris, L., Formelli, F., Pilotti, S., Pierotti, M.A. a Greco, A. 2008. Metallothionein 1G acts as an oncosuppressor in papillary thyroid carcinoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 88:474-481.
- Formigari, A., Irato, P. a Santon, A. 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*. 146:443-459.
- Franklin, R.B., Feng, P., Milon, B., Desouki, M.M., Singh, K.K., Kajdacsy-Balla, A., Bagasra, O. a Costello, L.C. 2005. hZIP1 zinc uptake transporter down regulation and zinc depletion in prostate cancer. *Molecular cancer*. 4:32.
- Gaither, L.A. a Eide, D.J. 2001. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *The Journal of biological chemistry*. 276:22258-22264.
- Garrett, S.H., Sens, M.A., Shukla, D., Flores, L., Somji, S., Todd, J.H. a Sens, D.A. 2000. Metallothionein isoform 1 and 2 gene expression in the human prostate: downregulation of MT-1X in advanced prostate cancer. *The Prostate*. 43:125-135.
- Gioeli, D. 2005. Signal transduction in prostate cancer progression. *Clinical science*. 108:293-308.
- Gumulec, J., Masarik, M., Krizkova, S., Hlavna, M., Babula, P., Hrabec, R., Rovny, A., Masarikova, M., Sochor, J., Adam, V., Eckschlager, T. a Kizek, R. 2012. Evaluation of alpha-methylacyl-CoA racemase, metallothionein and prostate specific antigen as prostate cancer prognostic markers. *Neoplasma*. 59:191-201.
- Haq, F., Mahoney, M. a Koropatnick, J. 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation research*. 533:211-226.
- Heidenreich, A., Aus, G., Bolla, M., Joniau, S., Matveev, V.B., Schmid, H.P., Zattoni, F. a European Association of, U. 2008. EAU guidelines on prostate cancer. *European urology*. 53:68-80.
- Henrique, R., Jeronimo, C., Hoque, M.O., Nomoto, S., Carvalho, A.L., Costa, V.L., Oliveira, J., Teixeira, M.R., Lopes, C. a Sidransky, D. 2005. MT1G hypermethylation is associated with higher tumor stage in prostate cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 14:1274-1278.

- Heyn, H., Li, N., Ferreira, H.J., Moran, S., Pisano, D.G., Gomez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J.V., Setien, F., Carmona, F.J., Puca, A.A., Sayols, S., Pujana, M.A., Serra-Musach, J., Iglesias-Platas, I., Formiga, F., Fernandez, A.F., Fraga, M.F., Heath, S.C., Valencia, A., Gut, I.G., Wang, J. a Esteller, M. 2012. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:10522-10527.
- Hogstrand, C., Kille, P., Nicholson, R.I. a Taylor, K.M. 2009. Zinc transporters and cancer: a potential role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation. *Trends in molecular medicine*. 15:101-111.
- Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Garshell, J., Neyman, N., Altekruse, S.F., Kosary, C.L., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Cho, H., Mariotto, A., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J. a Cronin, K.A. 2013. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010. *National Cancer Institute*.
- Huang, L., Kirschke, C.P. a Zhang, Y. 2006. Decreased intracellular zinc in human tumorigenic prostate epithelial cells: a possible role in prostate cancer progression. *Cancer cell international*. 6:10.
- Jeong, J. a Eide, D.J. 2013. The SLC39 family of zinc transporters. *Molecular aspects of medicine*. 34:612-619.
- Jin, R., Bay, B.H., Chow, V.T. a Tan, P.H. 2001. Metallothionein 1F mRNA expression correlates with histological grade in breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment*. 66:265-272.
- Jin, R., Chow, V.T., Tan, P.H., Dheen, S.T., Duan, W. a Bay, B.H. 2002. Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis*. 23:81-86.
- Johnson, L.A., Kanak, M.A., Kajdacsy-Balla, A., Pestaner, J.P. a Bagasra, O. 2010. Differential zinc accumulation and expression of human zinc transporter 1 (hZIP1) in prostate glands. *Methods*. 52:316-321.
- Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R. a Nagao, M. 2004. Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 61:49-68.
- Kawaciuk, I. 2009. Urologie. 1. vyd. Praha: Galén, 2009, 531 s. ISBN 978-807-2626-267.
- Klaassen, C.D., Choudhuri, S., McKim, J.M., Jr., Lehman-McKeeman, L.D. a Kershaw, W.C. 1994. In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein. *Environmental health perspectives*. 3:141-146.
- Kwabi-Addo, B., Chung, W., Shen, L., Ittmann, M., Wheeler, T., Jelinek, J. a Issa, J.P. 2007. Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 13:3796-3802.

- Lee, W.H., Morton, R.A., Epstein, J.I., Brooks, J.D., Campbell, P.A., Bova, G.S., Hsieh, W.S., Isaacs, W.B. a Nelson, W.G. 1994. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:11733-11737.
- Lu, D.D., Chen, Y.C., Zhang, X.R., Cao, X.R., Jiang, H.Y. a Yao, L. 2003. The relationship between metallothionein-1F (MT1F) gene and hepatocellular carcinoma. *The Yale journal of biology and medicine*. 76:55-62.
- Maret, W. a Li, Y. 2009. Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chemical reviews*. 109:4682-4707.
- Margoshes, M. a Vallee, B.L. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*. 79:4813-4814.
- Masko, E.M., Allott, E.H. a Freedland, S.J. 2013. The relationship between nutrition and prostate cancer: is more always better? *European urology*. 63:810-820.
- McCall, K.A., Huang, C. a Fierke, C.A. 2000. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *The Journal of nutrition*. 130:1437-1446.
- Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H. a Rodilla, V. 2000. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 35:35-70.
- Milon, B.C., Agyapong, A., Bautista, R., Costello, L.C. a Franklin, R.B. 2010. Ras responsive element binding protein-1 (RREB-1) down-regulates hZIP1 expression in prostate cancer cells. *The Prostate*. 70:288-296.
- Moleirinho, A., Carneiro, J., Matthiesen, R., Silva, R.M., Amorim, A. a Azevedo, L. 2011. Gains, losses and changes of function after gene duplication: study of the metallothionein family. *PloS one*. 6:18487-18493.
- Nguyen, A., Jing, Z., Mahoney, P.S., Davis, R., Sikka, S.C., Agrawal, K.C. a Abdel-Mageed, A.B. 2000. In vivo gene expression profile analysis of metallothionein in renal cell carcinoma. *Cancer letters*. 160:133-140.
- Ostrakhovitch, E.A., Olsson, P.E., Jiang, S. a Cherian, M.G. 2006. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS letters*. 580:1235-1238.
- Owen, D.H. a Katz, D.F. 2005. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of andrology*. 26:459-469.
- Pedersen, M.O., Larsen, A., Stoltenberg, M. a Penkowa, M. 2009. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Progress in histochemistry and cytochemistry*. 44:29-64.

- Penkowa, M. 2006. Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *The FEBS journal*. 273:1857-1870.
- Rajal, B.S. a Zhou, M. 2012. Prostate Biopsy Interpretation: An Illustrated Guide. New York: Springer, 185 p. ISBN 36-422-1369-3.
- Rishi, I., Baidouri, H., Abbasi, J.A., Bullard-Dillard, R., Kajdacsy-Balla, A., Pestaner, J.P., Skacel, M., Tubbs, R. a Bagasra, O. 2003. Prostate cancer in African American men is associated with downregulation of zinc transporters. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. 11:253-260.
- Roddam, A.W., Allen, N.E., Appleby, P. a Key, T.J. 2008. Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies. *Journal of the National Cancer Institute*. 100:170-183.
- Russell, P.J. a Kingsley, E.A. 2003. Human prostate cancer cell lines. *Methods in molecular medicine*. 81:21-39.
- Taylor, K.M., Vichova, P., Jordan, N., Hiscox, S., Hendley, R. a Nicholson, R.I. 2008. ZIP7-mediated intracellular zinc transport contributes to aberrant growth factor signaling in antihormone-resistant breast cancer Cells. *Endocrinology*. 149:4912-4920.
- Tekur, S. a Ho, S.M. 2002. Ribozyme-mediated downregulation of human metallothionein II(a) induces apoptosis in human prostate and ovarian cancer cell lines. *Molecular carcinogenesis*. 33:44-55.
- ÚZIS. 2012. Novotvary 2010 ČR. ÚZIS ČR, NOR ČR 2013.
- Verhage, B.A., Baffoe-Bonnie, A.B., Baglietto, L., Smith, D.S., Bailey-Wilson, J.E., Beaty, T.H., Catalona, W.J. a Kiemeny, L.A. 2001. Autosomal dominant inheritance of prostate cancer: a confirmatory study. *Urology*. 57:97-101.
- Wei, H., Desouki, M.M., Lin, S., Xiao, D., Franklin, R.B. a Feng, P. 2008. Differential expression of metallothioneins (MTs) 1, 2, and 3 in response to zinc treatment in human prostate normal and malignant cells and tissues. *Molecular cancer*. 7:7.
- Wein, A.J., Kavoussi, L.R. a Campbell, M.F. 2012. Campbell-Walsh urology. 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, ISBN 99960591894.
- Weiss, P. 2010. Sexuologie. Vyd. 1. Praha: Grada, 2010, ISBN 978-802-4724-928.
- Werynska, B., Pula, B., Muszczynska-Bernhard, B., Gomulkiewicz, A., Piotrowska, A., Prus, R., Podhorska-Okolow, M., Jankowska, R. a Dziegiel, P. 2013. Metallothionein 1F and 2A overexpression predicts poor outcome of non-small cell lung cancer patients. *Experimental and molecular pathology*. 94:301-308.

- Yamasaki, M., Nomura, T., Sato, F. a Mimata, H. 2007a. Metallothionein is up-regulated under hypoxia and promotes the survival of human prostate cancer cells. *Oncology reports*. 18:1145-1153.
- Yamasaki, S., Sakata-Sogawa, K., Hasegawa, A., Suzuki, T., Kabu, K., Sato, E., Kurosaki, T., Yamashita, S., Tokunaga, M., Nishida, K. a Hirano, T. 2007b. Zinc is a novel intracellular second messenger. *The Journal of cell biology*. 177:637-645.
- Yan, D.W., Fan, J.W., Yu, Z.H., Li, M.X., Wen, Y.G., Li, D.W., Zhou, C.Z., Wang, X.L., Wang, Q., Tang, H.M. a Peng, Z.H. 2012. Downregulation of metallothionein 1F, a putative oncosuppressor, by loss of heterozygosity in colon cancer tissue. *Biochimica et biophysica acta*. 1822:918-926.
- You, J., Cozzi, P., Walsh, B., Willcox, M., Kearsley, J., Russell, P. a Li, Y. 2010. Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. *Critical reviews in oncology/hematology*. 73:10-22.
- Zou, J., Milon, B.C., Desouki, M.M., Costello, L.C. a Franklin, R.B. 2011. hZIP1 zinc transporter down-regulation in prostate cancer involves the overexpression of ras responsive element binding protein-1 (RREB-1). *The Prostate*. 71:1518-1524